

Université de Montréal

**La Rapamycine inhibe l'expression de l'ARNm de
l'ADAMTS-4 induit par les cytokines dans les
chondrocytes articulaires**

Par

Sarah Khalifé

Département des Sciences Biomédicales, Université de Montréal

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de Maîtrise (M.Sc.)

En Sciences Biomédicales

Février, 2012

Sarah Khalifé, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

La Rapamycine inhibe l'expression de l'ARNm de l'ADAMTS-4 induit par les cytokines
dans les chondrocytes articulaires

Présenté par :

Sarah Khalifé

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Yahye Merhi, président-rapporteur
Muhammad Zafarullah, directeur de recherche
Mohammed Benderdour, membre du jury

Résumé

Introduction: Durant la pathogenèse d'ostéoarthrose (OA), les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β (Interleukin-1 beta) et TNF- α (Tumor necrosis factor alpha) stimulent la dégradation des agrécanes par l'aggrécanase-1 ou ADAMTS-4 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif). Ces cytokines peuvent stimuler plusieurs voies de signalisation conduisant ainsi à l'augmentation de l'expression des ADAMTS dans les chondrocytes humains. Les TIMPs (tissue inhibitor of metalloproteinases) présentent des inhibiteurs endogènes de l'ADAMTS. Nous avons démontré que la Rapamycine (un immunosuppresseur et un inhibiteur du mammalian target of Rapamycin (mTOR)) peut avoir des effets bénéfiques dans cette pathologie. Notre étude examine l'effet de la Rapamycine sur l'expression de l'ADAMTS-4 induit par les cytokines, son implication dans certaines voies de signalisation, et son effet sur l'expression du TIMP-3.

Méthodes: Des chondrocytes normaux sont traités avec la Rapamycine seule ou stimulés aussi avec l'IL-1 β et le TNF- α . Les effets de la Rapamycine sur l'expression de l'ADAMTS-4 et du TIMP-3 ont été étudiés par l'analyse RT-PCR et l'activité enzymatique a été étudiée par la technique d'ELISA. Les effets de la Rapamycine sur certaines voies de signalisation ont été étudiés par le Western blot.

Résultats: Nous avons trouvé que la Rapamycine inhibe l'expression de l'ARNm de l'ADAMTS-4 induit par les cytokines pro-inflammatoires dans les chondrocytes humains. L'activité enzymatique de l'ADAMTS-4 induit par l'IL-1 β a été légèrement diminuée par la Rapamycine. En plus, cette dernière a montré de différents effets sur plusieurs voies de signalisation stimulées par l'IL-1 β et le TNF- α telles que les voies des MAPKs (Mitogen activated protein kinase), de l'AKT, et de la p70 S6 kinase. La Rapamycine a inhibé partiellement l'activation de la phosphorylation de l'ERK1/2 MAPK (extracellular signal-regulated protein kinase MAPK) en présence du TNF- α seulement. En outre, la Rapamycine a inhibé la phosphorylation des protéines p38 MAPK, JNK (c-Jun N-terminal kinase), et AKT activée par l'IL-1 β seulement. En plus, la phosphorylation de la protéine

p70 S6K stimulée par l'IL-1 β et le TNF- α a été inhibée par la Rapamycine. D'autre part, nous avons démontré que le niveau du TIMP-3 a été augmenté en présence de la Rapamycine.

Conclusion: Ces résultats suggèrent que la Rapamycine peut bloquer l'action de l'ADAMTS-4 via l'inhibition de l'activation des MAPKs, de l'AKT, et de la p70 S6K. La Rapamycine pourrait ainsi être considérée pour la prévention de la perte du cartilage chez les patients ostéoarthritiques.

Mots-clés : Ostéoarthrose; cartilage; ADAMTS-4; aggrecanase-1; chondrocytes; interleukin-1 β ; tumor necrosis factor alpha; Rapamycine; transduction de signal.

Abstract

Introduction: During the pathogenesis of osteoarthritis, the pro-inflammatory cytokines IL-1 β (Interleukin-1 beta) and TNF- α (Tumor necrosis factor alpha) stimulate the degradation of aggrecans by aggrecanase-1 or ADAMTS-4 (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif). These cytokines may stimulate several signaling pathways leading to an increased expression of ADAMTS-4 in human chondrocytes. The TIMPs (tissue inhibitor of metalloproteinases) are endogenous inhibitors of ADAMTS-4. It has been shown that Rapamycin (an immunosuppressor and an inhibitor of the mammalian target of rapamycin or mTOR) may have beneficial effects in this pathology. Our study investigates the impact of Rapamycin on cytokine-induced expression of ADAMTS-4, its implication in certain signaling pathways, and its effects on the expression of TIMP-3.

Methods: Human chondrocytes were pretreated with different doses of Rapamycin either alone or stimulated with IL- β and TNF- α . The effect on ADAMTS-4 expression was examined by RT-PCR analysis and enzyme activity by ELISA. Impact of Rapamycin on the activation of different signaling pathways was measured by Western blot analysis.

Results: We have shown that Rapamycin down-regulated pro-inflammatory cytokines-induced ADAMTS-4 mRNA expression in human chondrocytes. The IL-1 β -induced-enzymatic activity of ADAMTS-4 was slightly inhibited by Rapamycin. Furthermore, Rapamycin presents different effects on pro-inflammatory cytokines-stimulated activation of certain signaling pathways such as MAPKs (Mitogen activated protein kinases), AKT, and p70 S6 kinase. Moreover, Rapamycin partially inhibits TNF- α -induced activation of phosphorylation of ERK1/2 MAPK (extracellular signal-regulated protein kinase MAPK). Thus, Rapamycin inhibits IL-1 β -induced activation of phosphorylation of the proteins p38 MAPK, JNK (c-Jun N-terminal kinase), and AKT. Also, Rapamycin inhibits IL-1 β and TNF- α -activation of phosphorylation of the protein p70 S6 kinase. In other words, we have shown that the level of TIMP-3 has been increased in the presence of Rapamycin.

Conclusion: These results suggest that Rapamycin down-regulates the expression of ADAMTS-4 by inhibiting the cytokine activation of MAPKs, AKT, and p70 S6 kinase. Thus Rapamycin could be considered as potential therapeutic agent for prevention of cartilage loss in patient with osteoarthritis.

Keywords : Osteoarthritis; cartilage; ADAMTS-4; aggrecanase-1; chondrocytes; interleukin-1 β ; tumor necrosis factor alpha; signal transduction; Rapamycin.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Table des matières	V
Liste des tableaux	Vii
Liste des figures	Viii
Remerciements	iX
Liste des abréviations	Xi
Chapitre I : Introduction	1
1. Cartilage	2
1.1 Structure	2
1.2 Facteurs de risque	3
2. Les chondrocytes	3
3. Matrice extracellulaire (ECM)	6
4. Les Agrécanes	6
5. L'ostéoarthrose (OA)	9
6. Mécanismes ostéoarthritiques	12
7. Les Aggrécanases (ADAMTS)	16
7.1 famille des ADAMTS	16
7.2 structure des ADAMTS	17
7.3 implication des ADAMTS dans la pathogenèse de l'OA	20
7.4 les inhibiteurs des ADAMTS	21
8. les Cytokines	22
8.1 l'interleukine-1	23
8.2 Le TNF- α	26
8.3 IL-1 et TNF- α dans la pathogenèse d'OA	27
8.4 Thérapie	29
9. Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK)	31
9.1 Les protéines extracellular signal-related kinase (ERK)	32
9.2 La protéine p38 kinase	33
9.3 Les protéines C-Jun N terminal kinase (JNK)	34
10. AKT	37
11. P70 s6 kinase	38

12. La Rapamycine	38
13. Hypothèse de la recherche	40
13.1 <i>objectif de la recherche</i>	40
13.2 <i>Hypothèse</i>	40
Chapitre II : Matériaux et Méthodes	42
Chapitre III : Résultats	50
Chapitre IV : Discussion	66
Chapitre V : Conclusion	75
Chapitre VI : Bibliographie	77

Liste des tableaux

Tableau 1: Composition des différentes amorces d'ADAMTS-4, GAPDH et TIMP-3	46
--	----

Liste des figures

<i>Figure 1:</i> Propriétés d'une articulation normale et ostéoarthritique	5
<i>Figure 2:</i> Organisation des différentes composantes du cartilage articulaire	8
<i>Figure 3:</i> Un aperçu des changements pathologiques associés avec l'ostéoarthrose	11
<i>Figure 4:</i> Interactions cellulaires dans la destruction du cartilage lors de l'ostéoarthrose..	14
<i>Figure 5:</i> Représentation schématique de l'organisation minimale du domaine des protéinases MMP, ADAM, et ADAMTS	19
<i>Figure 6:</i> Représentation schématique des récepteurs de l'interleukin-1 et sa voie de signalisation	25
<i>Figure 7:</i> Régulation du métabolisme cartilagineux par les cytokines et les facteurs de croissance au cours de la pathologie dégénérative du cartilage	30
<i>Figure 8:</i> Le résultat de la phosphorylation des différents isoformes des MAPK est l'activation des trois principales familles : ERK, JNK, et p38	36
<i>Figure 9:</i> Inhibition de l'expression de l'ARNm de l'ADAMTS-4 induit par l'IL-1 β et le TNF- α	52
<i>Figure 10:</i> La Rapamycine bloque partiellement l'expression du phospho-p44/42 stimulé par le TNF- α	55
<i>Figure 11:</i> La Rapamycine Inhibe l'expression de la JNK-MAPK et de la p38-MAPK stimulées par le TNF- α	58
<i>Figure 12:</i> La Rapamycine bloque l'expression de l'AKT stimulée par l'IL-1 β et de la p70S6K stimulées par les deux cytokines IL-1 β et TNF- α	61
<i>Figure 13:</i> La Rapamycine augmente légèrement l'expression du TIMP-3 dans les chondrocytes humains	64
<i>Figure 14:</i> Représentation schématique des différentes voies de signalisation induites par les cytokines et bloquées par la Rapamycine	73

*À celui qui m'a supporté durant mes études,
et m'a aidé à surmonter les difficultés*

Je dédie mon travail à mon fiancé Alaaeddine Tarabah

À ma famille et à mes amis...

Remerciements

Je remercie le docteur *Muhammad Zafar* parce qu'il m'a accueilli dans son laboratoire pour accomplir ma maîtrise chez lui durant ces deux années.

Je remercie *Judith Sylvester* qui m'a aidé beaucoup à me montrer les différentes techniques, et pour ses remarques durant mes travaux.

Je veux remercier encore ma famille au Liban: mon père *Hussein Khalifé*, ma mère *Lina Homsy*, mes deux frères, ainsi que ma famille ici au Canada présentée par mon oncle *Tarek Homsy* et *Rana Fakih* pour leur accueil dans leur domicile.

Avec tendresse je remercie mon fiancé *Alaaeddine Tarabah* pour son support et ses conseils durant mes études.

Un spécial remerciement est adressé à *Anas Chaar* qui était comme ma mère à l'étranger pour ses conseils et sa sympathie.

Liste des abréviations

ADAM	a disintegrin and metalloproteinase
ADAMTS	a disintegrin and metalloproteinase with trombospondin motif
ADAMTS-4	aggrecanase-1
ADAMTS-5	aggrecanase-2
Ala	Alanine
AP-1	activating protein-1
APRIL	a proliferation-inducing ligand
ATF-2	activating transcription factor 2
ATP	adenosine-5'-triphosphate
Arg	arginine
Asn	asparagine
BAFF	B cell activating factor belonging to the TNF family
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BLyS	B lymphocyte stimulator
BMP	bone morphogenetic protein
CaPPS	calcium pentosan polysulfate
CLIP-1	cartilage intermediate layer protein 1
COMP	cartilage oligomeric protein
COX-2	cyclooxygenase-2
CRD	cysteine-rich domain
CREB	cAMP response element-binding
CS	chondroitin sulfate
CUB	complement C1r/C1s Uefg, Bmp1
DD	death domain
DED	death effector domain
DISC	death-inducing signaling complex

ECM	extracellular matrix
EDA-A	ectodysplasin ligand A
eEF2K	eukaryotic elongation factor 2 kinase
EGF-like	epidermal growth factor-like
eIF-4B	eukaryotic initiation factor
Elk-1	E Twenty-six-like transcription factor 1
ERK	extracellular signal-regulated protein kinase
FADD	Fas Associated protein with Death Domain
FGF	fibroblast growth factor
GADD	growth arrest and DNA damage
GAG	glycosaminoglycan
GlcAT-I	β -1,3- glucuronyltransferase I
Glu	glutamic acid
Gly	Glycine
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GRO	growth related oncogene
HA	hyaluronic acid
HIF-1 α	hypoxia-inducible factor 1 alpha
His	histidine
HSP	heat choc protein
ICE	IL-1 converting enzyme
IFN- γ	interferon-gamma
IGD	intermediate globular domain
IGF	insulin-like growth factor
Ig-like	immunoglobuline-like
IKK	I κ B kinase
IL-1 β	interleukin-1 Beta
IL-6	interleukin-6
IL-7	interleukin-7

IL-8	interleukin-8
IL-17	interleukin-17
IL-18	interleukin-18
IL-1R	interleukin-1 receptor
IL-1Ra	interleukin-1 receptor antagonist
IL-1RAcP	interleukin-1 receptor accessory protein
iNOS	inducible nitric oxide synthase
IRAK	IL-1 receptor activating kinases
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KS	Keratan sulfate
LIF	leukemia inhibitory factor
LP	link protein
LPS	lipopolysaccharide
LT	lymphotoxine
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAP2K	MAPK kinase
MAP3K	MAPK kinase kinase
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1
MEF2	myocyte enhance factor
MEK	mitogen-activated protein kinase kinase
MEKK	MEK kinase
MMPs	matrix metalloproteinases
mPGE	prostaglandine E synthase microsomale
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
mTORC2	mammalian Target of Rapamycin Complex
Myc	myelocytomatosis
MyD88	myeloid differentiation factor 88
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NFκB	nuclear factor kappa B

NHAC	normal human articular chondrocyte
NK	natural killer
NO	nitric oxide
NTP	nucleoside triphosphates
OA	osteoarthritis
PDGF	platelet-derived growth factor
PDK-1	phosphoinositide-dependent kinase 1
PG	proteoglycan
PGE2	prostaglandin-E2
Phe	phenylalanine
PI3K	phosphoinositide 3 kinase
PKB	protein kinase B
PLA2	phospholipase A 2
PLAC	protease and lacunin domain
PRELP	proline-arginine rich end leucine-rich repeat protein
Proline	Pro
RA	rheumatoid arthritis
RIP	receptor-interacting protein
ROS	reactive oxygen species
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
SAPK	stress-activated protein kinase
Ser	serine
SIGIRR	Single Ig IL-1-related receptor
SRF	serum response factor
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription protein
sTNF	soluble TNF
TACE	TNF- α converting enzyme
TALL-1	TNF-and apoL-related leukocyte-expressed ligand
TGF- β	transforming growth factor beta

THANK	TNF homologue that activate apoptosis NFκ-B and C-jun Kinase
TIMPs	tissue inhibitor of metalloproteinases
TIR	toll/IL-1 receptor
tmTNF	transmembrane TNF
TNF-α	tumor necrosis alpha
TNF-R	tumor necrosis alpha receptor
TRADD	TNF receptor-associated DD
TRAF	TNF receptor associated factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRANCE	TNF related activation-induced cytokine
TS	thrombospondin type I-like
TSR	thrombospondin type I-like repetition
Tyrosine	Tyr
VEGF	vascular endothelial growth factor
Zn	Zinc

Chapitre I:

Introduction

1. Cartilage articulaire

1.1 Structure

Le cartilage articulaire est un tissu inerte non vascularisé, innervé, et non lymphatique. Il forme un support mécanique offrant un soutien pour le corps lors des mouvements et cela en diminuant les frictions et la douleur au niveau des articulations. Sa structure consiste en un seul type de cellules spécifiques appelé chondrocytes et d'une matrice extracellulaire (ECM). Quatre zones (ou couches) très organisées sont identifiées au niveau du cartilage articulaire:

- Une zone superficielle qui donne une grande rigidité et résistance au cartilage. Elle est formée des chondrocytes aplatis parallèles à la surface articulaire, d'une haute concentration en eau (jusqu'à 80%) et en fibres de collagènes qui se trouvent placer parallèlement à la surface articulaire, et d'une basse concentration en protéoglycanes (PGs).
- Une zone intermédiaire formée de fibres de collagènes plus épaisses mais avec une concentration plus basse que celle dans la zone superficielle. Elle est composée encore de PGs dont leur concentration est plus grande que celle dans la zone superficielle, et d'une faible concentration d'eau.
- Une zone radiale (ou profonde) formée de chondrocytes sphériques qui se trouvent perpendiculaires à la surface articulaire, des fibres de collagènes possédant le diamètre le plus épais. Elle possède la plus basse concentration en eau et la plus haute concentration en PGs.
- Une zone calcifiée présentant une zone adjacente à l'os sous-chondral qui le sépare de la zone radiale, elle est constituée par des cellules de volume très petit (1).

1.2 Facteurs de risque pour le développement de l'ostéoarthrose

Plusieurs facteurs de risques peuvent être responsables du développement de l'OA au niveau des articulations, tels que: l'âge, les troubles hormonales et métaboliques, les troubles immunologiques, l'inflammation, les lésions articulaires, les infections, l'obésité, la densité des os, la faiblesse des muscles, les activités sportives, des facteurs mécaniques et un régime alimentaire manquant de la vitamine D (2). En plus, cette maladie touche les femmes plus que les hommes (3); ainsi approximativement 10% des hommes et 13% des femmes souffrent de l'OA dans les genoux (2).

2. Les chondrocytes

Les chondrocytes sont des cellules hautement spécifiques qui présentent à peu près 3% de la masse du cartilage (4). Ils sont dispersés dans la matrice extracellulaire dans des petits espaces ostéocytaires, localisés ainsi avec un réseau extracellulaire formé de l'eau, des PGs et des fibres de collagènes. Les chondrocytes peuvent être stimulés par plusieurs facteurs comme les facteurs de croissance, les cytokines et les forces biomécaniques qui peuvent augmenter le métabolisme cellulaire. On peut trouver les chondrocytes dans toutes les zones du cartilage, ainsi ils se différencient par leur taille, leur forme, et leur activité métabolique; tandis qu'ils contiennent tous les mêmes organites nécessaires comme l'appareil de Golgi et le Réticulum endoplasmique. On peut trouver des cellules aplaties et parallèles à la surface articulaire dans la couche superficielle, des cellules arrondies avec des fibres plus épaisses dans la couche intermédiaire et des cellules avec des fibres épaisses formant des colonnes parallèles et perpendiculaires à la surface articulaire dans la couche radiaire (1) (Fig.1). Les chondrocytes maintiennent un taux de prolifération élevé qui avec l'âge va diminuer (5). Les chondrocytes sont responsables de la maintenance de l'ECM et cela par le remplacement des composés dégradés de la matrice puisqu'ils assurent la synthèse des composants du cartilage. En plus, les chondrocytes sont responsables de la dégradation de ces composants par l'augmentation de l'expression des protéinases; d'où

leur principal rôle dans la maintenance de l'équilibre entre l'anabolisme et le catabolisme au niveau du cartilage. Pour cela l'altération au niveau de ces cellules peut contribuer à la progression de la dégénération du cartilage articulaire, d'où ça amène à plusieurs maladies au niveau du cartilage tel que l'OA (6).

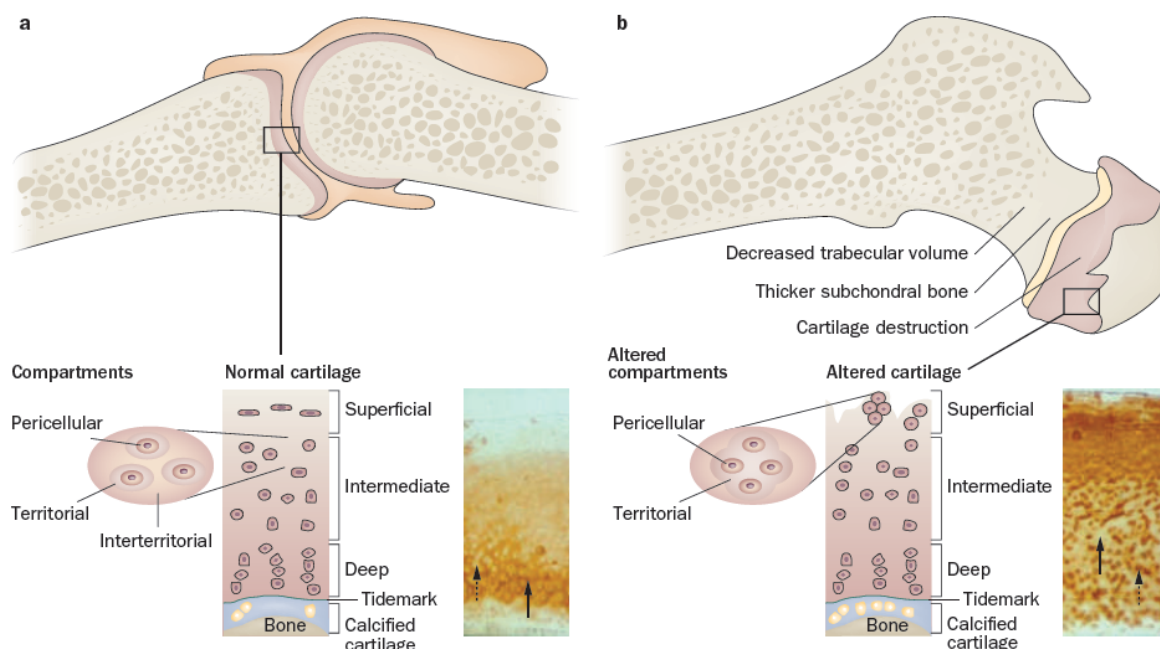


Figure 1: Propriétés d'une articulation normale et ostéoarthritique. (a) une articulation saine avec un cartilage articulaire normal, le cartilage articulaire est organisé en des zones péri-cellulaires, territoriales, et interterritoriales, chacune d'elles présentes à une distance spécifique des chondrocytes. L'immunohistochimie montre que les zones territoriales et péri-cellulaires (flèche pointillée) ne montrent pas de coloration pour les COMPs (cartilage oligomeric protein), alors que la zone interterritoriale (flèche solide) montre une coloration pour les COMPs. (b) une articulation ostéoarthritique présente une perte de cartilage et des altérations dans l'os sous-jacente. Les composantes du cartilage sont altérées même dans les stades précoces de la maladie. La perte des COMPs dans la zone interterritoriale (flèche solide) est vue par immunohistochimie où des COMPs nouvellement synthétisées sont déposées principalement dans la zone péri-cellulaire (flèche pointillée) (7).

3. Matrice extracellulaire (ECM)

L'ECM est composée d'une part de l'eau (80% de la masse du cartilage articulaire) contenant du gaz, des petites protéines, et de certains métabolites; et d'autre part des fibres de collagènes, des PGs, des protéines non collagéniques et des glycoprotéines. Les fibres de collagènes constituent 60% de la masse totale du cartilage articulaire. Il existe plusieurs types de collagènes tels que collagène II, VI, IX, X, et XI. Le collagène II forme la majorité des fibres du collagène du cartilage articulaire (90% à 95%) organisés dans un réseau complexe. Ce réseau inclue des agrégats de PGs appelés agrécanes qui en forment la partie majeure. Il est formé aussi d'autres constituants comme les COMPs (cartilage oligomeric proteins), les protéines de liaison (LP), les fibronectines, et d'autres petites PGs comme les fibromodulines, les biglycanes, et les décorines. Ces constituants sont répartis dans deux régions de l'ECM : une région territoriale riche en collagènes type IV et en agrécanes tout en formant une structure organisée; et une région interterritoriale contenant des fibres de collagènes de diamètre plus large (Fig.2) (1) (7).

4. Les Agrécanes

L'agrécanne constitue la partie majeure des PGs (35% de la masse des protéines situées dans le cartilage). Sa structure très organisée forme des agrégats liés à l'acide hyaluronique (HA).

La structure de l'agrécanne comporte trois domaines dont deux se situent dans la partie N-terminale, et un troisième se situant dans la partie C-terminale :

Le domaine globulaire G1 est situé dans la partie N-terminale où il se lie au HA par la LP. Ce domaine G1 est séparé du domaine G2, qui est aussi dans la partie N-terminale, par un domaine interglobulaire (IGD) qui contient à peu près 150 acides aminés. Dans la partie C-terminal, on trouve le domaine G3 séparé du domaine G2 par une longue chaîne formée de

110 chondroïtine sulfate (CS) et de 30 sulfates de Kératine (KS) ou plus. Ainsi, l'agrécan possède plusieurs sites de clivage reconnus par des enzymes protéolytiques: les métalloprotéinases (MMPs) et les aggrécánases appelés encore ADAMTS. En effet, cette organisation des agécanes en agrégat présente une importance dans la structure du cartilage; pour cela la dégradation des agrécanes joue un rôle essentiel dans l'apparition de l'OA (8) (9).

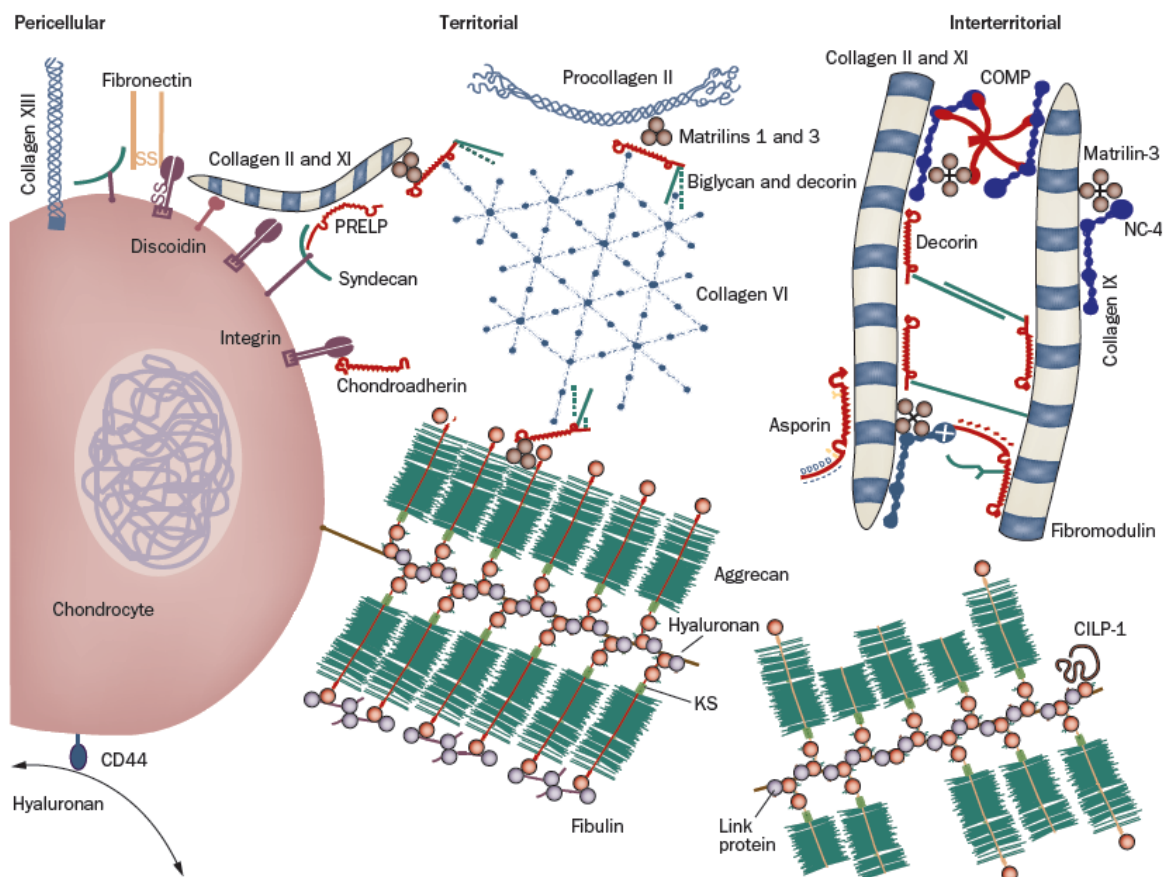


Figure 2: Organisation des différentes composantes du cartilage articulaire. La zone péri-cellulaire se trouve autour de la cellule et présente des composantes qui interagissent avec les récepteurs de la surface cellulaire. À côté de la zone péri-cellulaire se trouve la zone territoriale. À une distance plus longue, la zone interterritoriale se trouve. Les types de collagènes et des protéines liantes les collagènes qui forment la matrice diffèrent d'une zone à l'autre. CLIP-1: cartilage intermediate layer protein 1; PRELP: proline-arginine-rich end leucine-rich repeat protein (7).

5. L'ostéoarthrose (OA)

L'OA est une forme grave des maladies rhumatismales caractérisée par la dégradation progressive du cartilage articulaire, une inflammation synoviale (10) (11), un remodelage de l'os sous-chondral (sclérose) (11), la formation de nouveau os appelés ostéophytes (10) (11), ainsi que la minéralisation de l'ECM, la perte des PGs, une hypertrophie des chondrocytes, l'œdème, des fibrillations, l'érosion et la déformation de la surface du cartilage articulaire (12). Alors, cette maladie n'affecte pas seulement le cartilage mais toute l'articulation jusqu'à qu'elle touche l'os sous-chondral, les muscles péri-articulaires (13), les synoviales, les ligaments, les tendons, et les ménisques (14) (Fig.3). Plusieurs facteurs jouent un rôle dans la manifestation de l'OA. Mais le facteur le plus important est l'âge (15); puisque c'est vu que la majorité de la population qui sont de 65 ans et plus présente l'OA. Cela est dû à des altérations de la composition ou l'organisation des composants articulaires (PGs, collagènes). L'équilibre entre le catabolisme et l'anabolisme des composants articulaires assuré par les chondrocytes sera affecté; d'où le phénomène du catabolisme (dégradation du cartilage) sera plus grand que celui d'anabolisme (réparation du cartilage). Ce déséquilibre est dû à une production des enzymes protéolytiques par les chondrocytes stimulées par le stress, blessures, stress oxydatif ou le vieillissement de la matrice. Pour certains patients, l'inflammation joue un rôle important dans le développement de l'OA et ainsi elle va amener à l'apparition de la douleur (7) (16). Elle semble être une des causes principales qui mène à la production des cytokines inflammatoires et alors à l'augmentation de la production des facteurs cataboliques comme les protéinases (7). Cette maladie ne dépend pas de l'âge seulement (12); d'autres importants facteurs de risque ont été identifiés comme facteurs initiant l'OA, tels que des facteurs mécaniques ou des mutations au niveau du collagène du type II (13) (17) (18). En outre, plusieurs études se reposent sur l'observation de quelques marqueurs biologiques (COMP, HA, C-reactive protein) durant le processus d'OA. Ces marqueurs ont été trouvés avec des hautes concentrations lors de l'OA; d'où l'hypothèse qu'il y a une association

entre l'OA avec des changements structurels au niveau de l'articulation (13). Ces composantes sont des marqueurs de l'inflammation synoviale ou de la destruction des articulations qui reflètent la présence d'une OA. En plus de ces marqueurs, on peut trouver une augmentation du nombre des cellules immunitaires comme les lymphocytes B et T (19).

Cette maladie présente plusieurs symptômes tels que des douleurs au niveau des articulations, des inflammations, une rigidité, une déformation articulaire (16) et une perte de mobilité due à la présence des ostéophytes. Ces ostéophytes se forment au niveau de l'os sous-chondral et entraîne un blocage mécanique (15). Elle atteint le plus souvent les mains, les genoux et les hanches. Ainsi, l'OA est divisée en deux catégories : l'OA primaire qui est une maladie dégénérative du cartilage dont son origine n'est pas connue; et l'OA secondaire qui est la plus répandue, et qui peut avoir comme origine une défection au niveau du cartilage (15) (16).

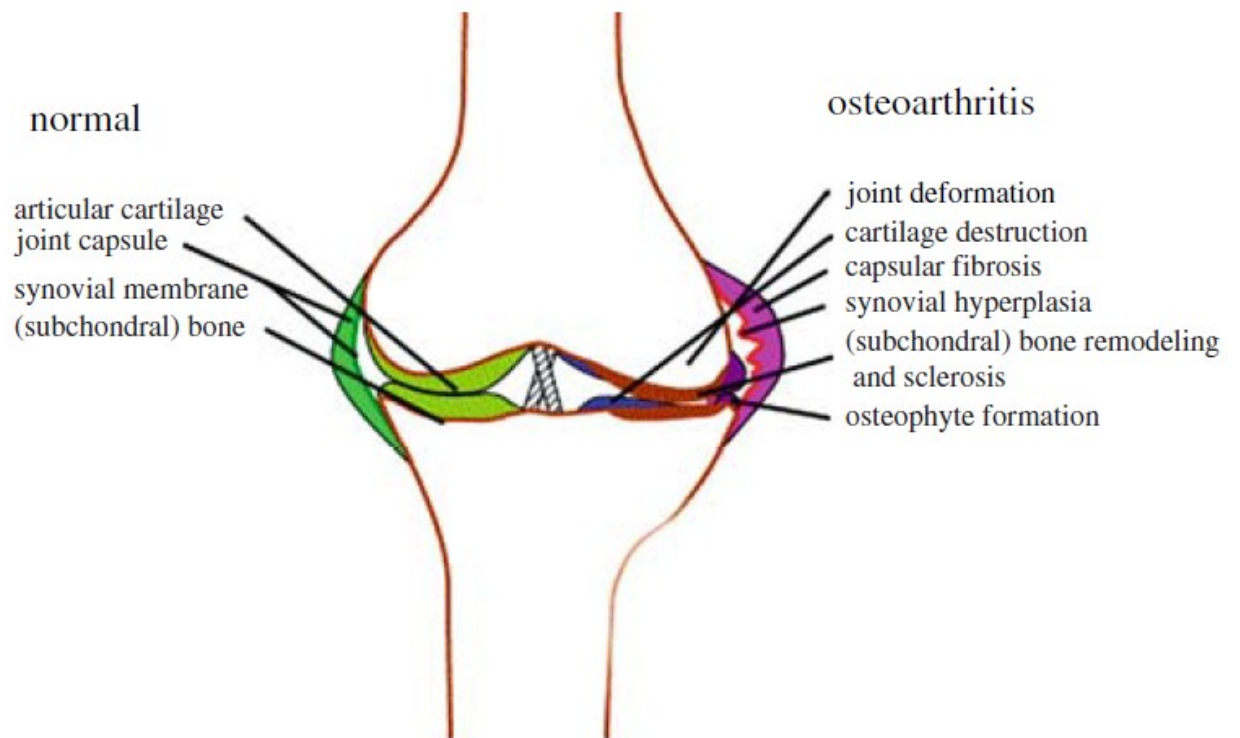


Figure 3: Un aperçu des changements pathologiques associés avec l'OA. À part de la destruction du cartilage, la fibrose de la capsule synoviale, l'hyperplasia de la membrane synoviale, le remodelage de l'os sous-chondral, et la formation d'ostéophytes contribuent à cette maladie (15).

6. Mécanismes ostéoarthritiques

L'OA est une maladie dégénérative comportant plusieurs mécanismes. Elle est due à des altérations du métabolisme du cartilage dont l'une des causes principales est le déséquilibre qui se passe entre la synthèse et la dégradation des composants de l'ECM (14). Les chondrocytes responsables de la balance entre l'anabolisme et le catabolisme vont produire des médiateurs inflammatoires comme les cytokines et les chimiokines (interleukine-1(IL-1), interleukine-6 (IL-6), interleukine-7 (IL-7), interleukine-8 (IL-8), interleukine-17 (IL-17), interleukine-18 (IL-18), la protéine MCP-1 (monocyte chemoattractant protein), le LIF (Leukemia inhibitory factor), le GRO (growth related oncogene), et l'oncostatin M); ainsi que des espèces réactives d'oxygène (ROS) et de nitrogène (oxyde nitrique (NO), superoxyde, peroxyde d'hydrogène, peroxynitrite) et des dérivés lipidiques (prostaglandines, leucotriènes) (13) (14). Ces médiateurs inflammatoires sont responsables de la dégradation du cartilage; ceci en stimulant les chondrocytes à libérer les enzymes protéolytiques tels que les MMPs et les ADAMTS (ADAMTS-4, ADAMTS-5, ADAMTS-19), et en inhibant la synthèse de différents métabolites qui composent l'ECM (14).

Certains facteurs sont responsables de la maintenance de l'anabolisme du cartilage. Ce sont les agrécanes et le collagène type II. Lorsqu'une lésion se passe dans le cartilage articulaire, il y aura des modifications structurales au niveau de l'ECM comme la diminution des agrégats d'agrécanes qui sont probablement les premiers constituants affectés (19). D'où les chondrocytes vont agir pour fixer ce déficit en augmentant la synthèse de l'agrécanes. Mais la composition de ces agrécanes diffère de ceux d'un adulte normal (19) (20). Après un certain temps, les chondrocytes ne peuvent plus compenser la diminution du taux des agrégats dans l'ECM (19); leur concentration devient alors très basse malgré l'augmentation de leur synthèse (20). D'autres parts, le collagène type II est un autre composant du cartilage articulaire qui sera affecté, et va être aussi dégradé (19); cette action est médiée par les cytokines, spécifiquement l'IL-1 qui stimulent les chondrocytes à dégrader ces composants (21).

Les chondrocytes dans le cartilage OA sont trouvés dans une forme hypertrophique, exprimant un niveau élevé de MMP-13, en plus du collagène type X, Runx2 (RUNT-related transcription factor 2), des phosphatases alcalines, et de l'ostéocalcine (21). Runx2 est un facteur de transcription qui régule la transition des chondrocytes prolifératifs en chondrocytes hypertrophiques et qui régule aussi l'expression de VEGF (vascular endothelial growth factor) conduisant à l'angiogenèse (22). Ainsi, de nouveaux vaisseaux sanguins seront formés dans l'os sous-chondral envahissant le cartilage articulaire (23). Ce processus sera associé avec la modification de l'architecture de l'os sous-chondral trabéculaire, la formation de nouvel os (ostéophytes) et donc la progression de l'OA (24). Ces ostéophytes sont associées à la prolifération des cellules périostales aux bords des articulations; ce qui mènent donc à une ossification endochondrale. Des études ont indiqué que cette ossification implique des facteurs de croissance comme TGF- β (transforming growth factor beta) et BMP-2 (bone morphogenetic protein 2); ces facteurs jouent un rôle dans l'apparition d'ostéophytes (24).

Dans d'autre part, des études ont démontré l'important rôle du TGF- β dans la prolifération et l'augmentation du nombre des chondrocytes qui présentent des récepteurs de TGF- β . Alors que certains facteurs comme le NO et les ROS diminuent l'expression de ces récepteurs TGF- β . Les chondrocytes ne peuvent plus répondre à la stimulation par les TGF- β lors de l'OA (21) (25); d'où la diminution de l'un des importants facteurs du voie anabolique (25). D'autres importants facteurs anaboliques sont trouvés diminuer lors de l'OA comme le PDGF (platelet-derived growth factor), le bFGF (basic fibroblast growth factor), et l'IGF-I (insulin-like growth factor I) qui stimulent dans le cas normal la production des PGs et des collagènes; ainsi que les BMPs qui stimulent la production des PGs (25). Des études ont montré que le cartilage articulaire est une cible pour des voies de signalisation induites par TGF- β , BMP, et FGF (fibroblast growth factor) (12). Alors le NO et les ROS sont aussi des facteurs importants dans le développement de l'OA; cela en causant du stress oxydatif et des dommages oxydatifs dans les chondrocytes; ce qui va initier l'hypertrophie cellulaire (25). Cette étape est associée avec la minéralisation de

l'ECM, la calcification du cartilage articulaire (12) et l'augmentation de l'apoptose des chondrocytes (26) (Fig.4).

Osteoarthritis

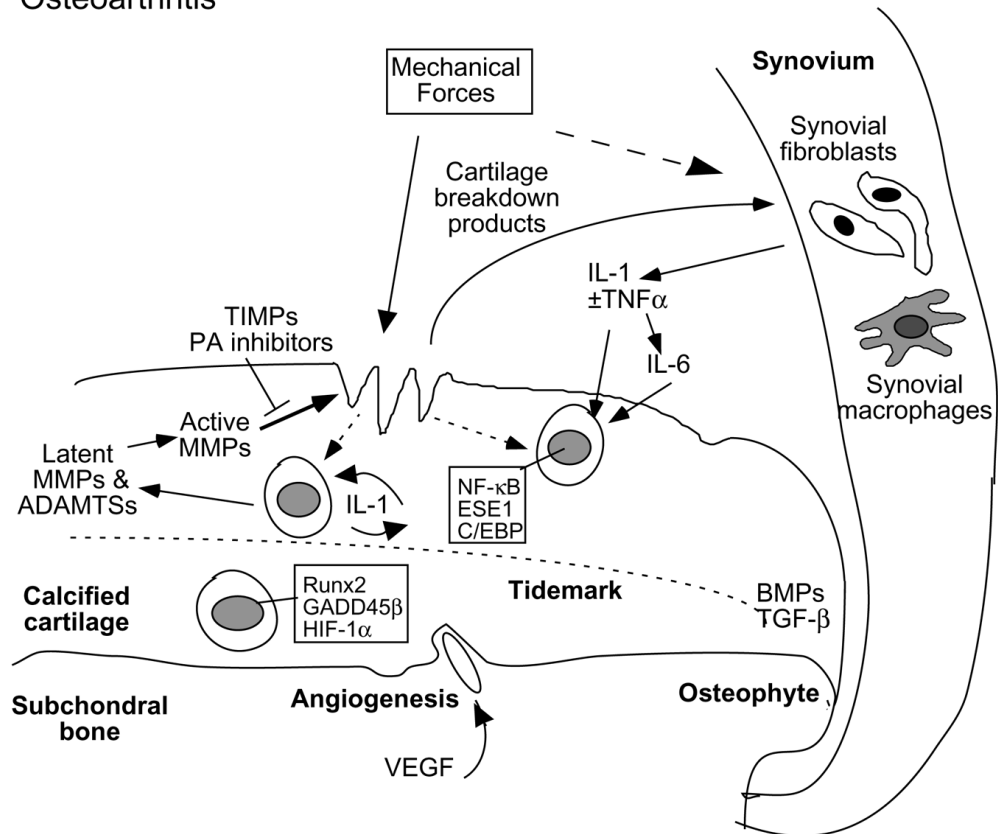


Figure 4 : Interactions cellulaires dans la destruction du cartilage lors de l'OA. La destruction du cartilage est due à plusieurs mécanismes et des facteurs biologiques. L'induction du stress cellulaire, cytokines cataboliques (IL-1 β , TNF- α), chimiokine, et autres médiateurs inflammatoires produits par les cellules synoviales et les chondrocytes résultent dans l'augmentation des enzymes protéases (familles de MMP et ADAMTS) (27).

7. Les aggrécanases (ADAMTS)

7.1 Famille des ADAMTS

Les ADAMTS présentent une famille de protéinases. Ce sont des enzymes extracellulaires (28) impliquées dans le développement et la progression de l'OA (29). Selon leurs fonctions, ces protéines sont divisées en 4 groupes :

Le premier groupe comportant : ADAMTS-1, -4, -5, -8, -9, -15, et -20. Ce groupe est divisé en deux sous-groupes : le premier composé de : ADAMTS-9 et -20 et l'autre composé de : ADAMTS-1, -4, -5, -8, et -15.

Le deuxième groupe composé de : ADAMTS-2, -3, et -14.

Le troisième groupe comportant seulement l'ADAMTS-13.

Le quatrième groupe regroupe les autres membres d'ADAMTS répartis en quatre paires: ADAMTS-19 et -17, ADAMTS-18 et -16, ADAMTS-12 et -7, et ADAMTS-10 et -6 (29) (30).

ADAMTS-4 et ADAMTS-5 ont été les premiers ADAMTS découvertes. Leur nom était aggrécanase-1 et aggrécanase-2, respectivement (31). En premier lieu, il a été connu que les MMPs sont des enzymes qui dégradent l'agrécan au niveau d'IGD entre les deux acides aminés, l'acide aspartique (Asn) et la phénylalanine (Phe). Après, des études ont montré qu'une autre famille d'enzymes coupe l'agrécan au niveau d'IGD mais entre les deux acides aminés, l'acide glutamique (Glu) et l'alanine (Ala); ces enzymes sont nommées aggrécanases (32). Les ADAMTS-4 et -5 jouent un rôle très important dans la progression de l'OA, ainsi leur principal substrat est l'agrécan. ADAMTS-4 peut avoir encore comme substrats d'autres composants de l'ECM tels que le COMP, la décorine, la fibromoduline, et la versicane (33).

7.2 Structure des ADAMTS

Les ADAMTS sont secrétées premièrement sous forme de pré-pro-enzymes dont la structure contient un pro-domaine au niveau N-terminale, un domaine catalytique avec le motif de fixation de zinc (Zn): Histidine (His)-Glu-X-X-His-X-X-X-X-His (34), un domaine de désintégrine, un peptide signal, un domaine riche en cystéine (CRD) contenant une séquence de 10 résidues de cystéines (29), un motif contenant une répétition thrombospondine type I-like (TSR) important pour la reconnaissance et le clivage des agrécanes (35), une région spacer et du TSR au niveau C-terminale qui varient entre 0 (ADAMTS-4) et 14 (ADAMTS-20). Ces répétitions sont importantes pour la liaison de ces enzymes aux substrats de l'ECM, en constituant un domaine de liaison aux glycosaminoglycanes (GAG) (29) (30). Alors que pour ADAMTS-4, cette liaison se fait dans la partie C-terminale par la région spacer (30). Quelques types d'ADAMTS présentent un domaine PLAC (protease and lacunin domain) au niveau C-terminale (ADAMTS-2, -3, et -14), ou des domaines CUB (complément C1r/C1s Uefg, Bmp1) et BMP-1 qui se trouvent au niveau C-terminale de l'ADAMTS-13 (29) (31).

Les ADAMTS appartiennent à la famille des MMPs; elles forment par leur structure une partie d'une famille de protéinases appelée ADAM (a disintegrin and metalloproteinase). Toutes ces trois familles possèdent un domaine catalytique ayant une haute similarité, et contenant le motif de la fixation du Zn ayant la séquence HEXXHXXGXXH. ADAMTS et ADAMs se diffèrent des MMPs par la présence du CRD et d'un domaine désintégrine. Alors que la différence entre ADAMTS et ADAMs est que les ADAMTs possèdent des régions TSR une région spacer au niveau C-terminale, tandis ce que les ADAMs possèdent un domaine EGF-like (epidermal growth factor-like), un domaine cytosolique au niveau C-terminale et des domaines transmembranaires qui caractérisent les ADAMs et leurs donnent la spécificité de se lier à la membrane au contraire des ADAMTS (29) (31) (Fig.5).

Les protéines ADAMTS contiennent à côté du site catalytique un site furine, qui peut être clivé par les protéases furine-like (34), d'où ADAMTS va être activé par une pro-protéine

convertase pour être secrété sous la forme active dans le milieu intracellulaire (35). ADAMTS-4 va subir d'autres processus post-traductionnels jusqu'à qu'il devient sous sa forme active ayant une activité enzymatique élevée (31) (36).

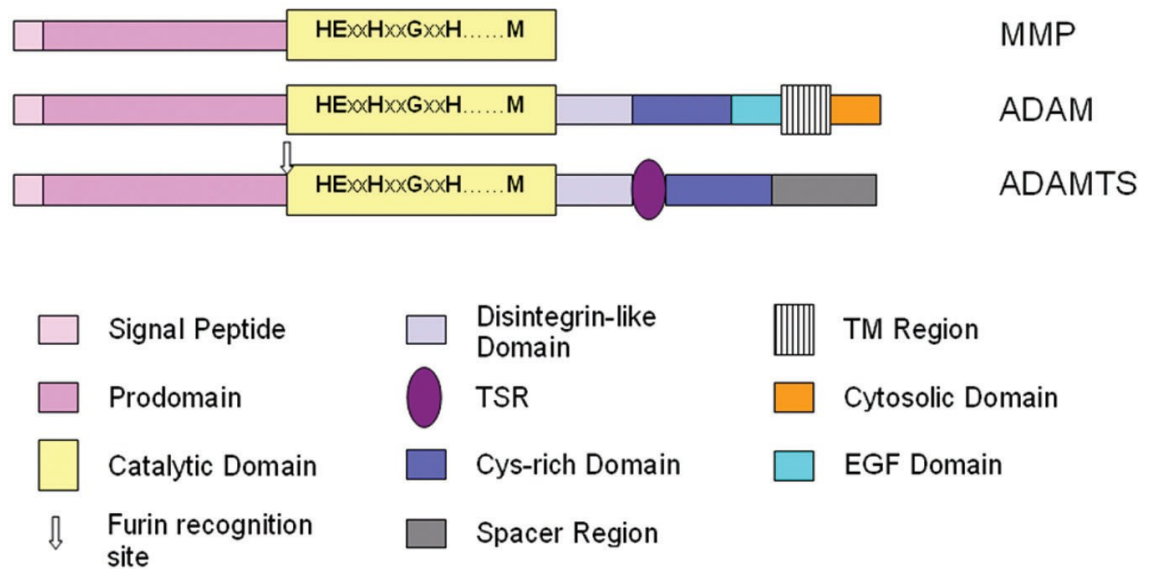


Figure 5: Représentation schématique de l'organisation minimale du domaine des protéinases : MMP, ADAM, et ADAMTS (29).

7.3 Implication des ADAMTS dans la pathogénie de l'OA

Beaucoup d'études ont montré le rôle et l'implication des MMPs dans l'OA; alors qu'avec le temps les études des ADAMTS impliqués fortement dans la pathogenèse d'OA ont été augmentées. Les ADAMTS possèdent une activité destructive. Il a été démontré que dans plusieurs pathologies arthritiques (rheumatoid arthritis (RA), OA), le liquide synovial de certains patients présente des fragments d'agrécane ayant la séquence Ala-Arginine (Arg)-Glycine (Gly)-Serine (Ser) qui se trouve au niveau de la partie N-terminal. Ceci est dû aux ADAMTS qui ont clivé les agrécane entre Glu 373-Ala 374 de l'IGD; d'où ça amène à la destruction du cartilage et la progression de l'OA. (34) (37) (38). Cependant, il existe d'autres sites de clivage pour ADAMTS-4 et -5 : Glu1545-Gly1546, Glu1714-Gly1715, Glu1819-Ala1820, et Glu1919-Leucine1920. (9) (39). Alors que le site de clivage pour les MMPs est au niveau Asn341-Phe342 (32) (35).

La dégradation des agrécane par les ADAMTS nécessite une étape de glycosylation de ces agrécane; ainsi les produits obtenus après cette dégradation sont deux fragments appelés: ARGSV portant la partie N-terminale et NITEGE ayant la séquence G1-Asn-Isoleucine-Thréonine-Glu-Gly-Glu (9) (11).

Des études ont montré qu'ADAMTS-4 peut cliver d'autres constituants de l'ECM et pas seulement l'agrécane. Ainsi, il peut cliver le COMP, la fibromoduline, la décorine. (40), et les deux petits PGs versicane et brevicanes (36) (41). La dégradation des agrécane par l'ADAMTS-4 et l'ADAMTS-5 constitue un potentiel facteur du développement de l'OA. ADAMTS-4 et -5 sont les enzymes les plus importants dans l'OA puisque ces deux enzymes sont hautement exprimées lors de cette maladie. Ils contribuent ainsi à la dégradation des agrécane et donc à la diminution de leur nombre (33). Ce rôle important de ces ADAMTS dans la pathogenèse d'OA a été appuyé par des modèles animaux qui ne présentaient pas un phénotype anormal lors du knockout du gène ADAMTS-4 (42). Certains facteurs augmentent l'activité d'ADAMTS-4 dans le cartilage humain, telles que

les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , et TNF- α (30), et l'oncostatine M secrétée par les neutrophiles et les macrophages (43).

7.4 Les inhibiteurs des ADAMTS

L'activité des ADAMTS-4 et -5 peut être inhibée par plusieurs produits endogènes tels que les TIMPs, ou exogènes. Ainsi l'inhibition de ces enzymes va diminuer le catabolisme des agrécanes. Les TIMPs sont généralement des inhibiteurs des MMPs. TIMP-1 et TIMP-2 inhibent fortement les MMPs tandis qu'ils inhibent faiblement l'ADAMTS-4 et -5 (44) (45). Alors que le TIMP-3 est trouvé comme un fort inhibiteur de l'ADAMTS-4 et -5. Ainsi, le TIMP-3 inhibe l'expression de ces ADAMTS stimulés par l'IL-1 β (45) (46). D'autres inhibiteurs endogènes peuvent diminuer l'expression de l'ADAMTS-4 et de l'ADAMTS-5 tels que le FGF-2 (47) et α 2-Macroglobuline (48). Il existe d'autres inhibiteurs synthétiques des ADAMTS-4 et ADAMTS-5 tels que le CaPPS (calcium pentosan polysulfate) qui augmente l'expression des TIMP-3 (49), les nobiletines (50), certains acides gras non saturés N-3 (51), ainsi que l'interaction de la partie C-terminale des fibronectines avec les ADAMTS qui inhibe la dégradation des agrécanes (52). En plus, certains médicaments inhibent encore l'expression des ADAMTS tels que le glucosamine (53), et le mannosamine (54), ainsi que certains produits d'origine naturelle peuvent inhiber l'expression de l'ADAMTS-4 induit par l'IL-1 β tels que la curcumine, la quercétine (62) et le resvératrol (55).

8. Les Cytokines

Les cytokines sont des substances très connues principalement lors d'une inflammation. Elles sont secrétées par les cellules du système immunitaire : macrophages, monocytes (56) et neutrophiles (57), et par plusieurs autres types de cellules tels que les ostéoblastes, les chondrocytes et les tissus synoviaux (58) au niveau du cartilage articulaire pour être libérés dans le liquide synovial.

Il existe plusieurs familles de cytokines :

-les cytokines pro-inflammatoires :

Les principales cytokines pro-inflammatoires sont l'IL-1 et le TNF- α . Ce sont des facteurs essentiels qui induisent l'expression des ADAMTS dans le cartilage OA et inhibent l'expression des TIMPs (59). Ils provoquent la diminution du nombre des agrécanes et du collagène type II et augmentent alors le développement de la maladie (60). D'autres types de cytokines pro-inflammatoires sont inclus dans l'augmentation de l'expression des ADAMTS. Ce sont l'IL-6, l'IL-15, l'IL-18, l'IL-21, le LIF, et l'IL-8, dans le cartilage OA; l'IL-17, le GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) et l'oncostatine M dans le cartilage RA principalement (58) (61) (62). Cependant, l'IL-6, l'IL-8, et le LIF sont considérés comme des cytokines régulatrices; ils sont stimulés par l'action de l'IL-1 β (63).

-Les cytokines anti-inflammatoires sont des cytokines inhibitrices qui affectent la production des cytokines pro-inflammatoires et diminuent leur activité. Ce sont l'IL-4, l'IL-10, l'IL-13, l'IL-11, l'IL-Ra (interleukin-receptor antagonist), et l'IFN- γ (interferon-gamma) (6).

Alors qu'il y a d'autres cytokines anaboliques induisant la production des PGs et des collagènes tels que le TGF- β (66), l'IGF-I, les BMPs (9, 16, 17, 20, 27, 63) et les FGFs (2, 6, 9).

8.1 L'interleukine-1

L'IL-1 est une cytokine pro-inflammatoire qui constitue un facteur très important dans la réponse immunitaire, et cela en activant la production d'autres cytokines inflammatoires pour former un mécanisme de défense contre les invasions microbiennes (64). En plus, l'IL-1 joue des rôles multiples dans plusieurs maladies tels que les troubles neuro-dégénératives (Alzheimer, le syndrome de down), la fibrose pulmonaire, les maladies rhumatoïdes (OA, RA) (65) (66) et beaucoup d'autres maladies inflammatoires (67).

L'IL-1 consiste en une famille formée de l'IL-1 α , l'IL-1 β qui sont deux cytokines agonistes pro-inflammatoires et de l'IL-1Ra qui est un antagoniste du récepteur d'IL-1.

L'IL-1 α et L'IL-1 β sont synthétisées à partir des précurseurs pro-IL-1 α et pro-IL-1 β par l'action d'une enzyme appelée ICE (Interleukin converting enzyme) (67). L'IL-1 possède deux types de récepteur : un récepteur de l'IL-1 de type I (IL-1RI) et un récepteur de type II (IL-2RII). Ce sont des récepteurs transmembranaires formés par trois domaines l'un extracellulaire, l'autre intracellulaire séparés tous les deux par un domaine transmembranaire. La partie extracellulaire de ces deux types de récepteurs se ressemble. Elle comporte trois domaines d'Ig-like (immunoglobuline-like) qui forment un site de liaison d'IL-1. Le domaine transmembranaire est formé par une petite région contenant d'acides aminés. Le domaine intracellulaire de l'IL-1RI se diffère de celui d'IL-1RII par sa structure et sa fonction. Ainsi la partie cytoplasmique de l'IL-1RI est formée d'une longue chaîne d'acides aminés et présente un domaine appelé TIR (Toll/IL-1R) nécessaire pour l'initiation de la transduction du signal (68). Par contre, l'IL-1RII est formé d'une courte chaîne d'acides aminés au niveau de son domaine intracellulaire et ne présente pas le domaine TIR; et donc il n'y aura pas de transduction de signal lors de la liaison de l'IL-1 à la partie extracellulaire. Pour que la signalisation initie, une autre protéine accessoire va se lier à l'IL-1R pour former un complexe d'initiation; c'est la protéine accessoire du récepteur (IL-1RACP). Ce complexe formé va activer alors plusieurs voies de signalisation. Une protéine adaptrice appelée MyD88 (myeloid differentiation factor 88) va se recruter au

complexe IL-1R - IL-1RACP, d'où le recrutement de la protéine IRAK (IL-1 receptor activating kinases) et la protéine TRAF (TNF receptor activating factor-6). Ces dernières vont se lier au complexe et vont être phosphorylées (Fig.6). Par la suite de la formation du complexe IL-1RI – IL-1RACP – MyD88-IRAK- TRAF-6, il y aura une activation d'une cascade de protéines; ce qui amène à la transduction de plusieurs voies de signalisation comme la voie du phosphoinositide 3 kinase (PI3K), la voie de l'I κ B kinase (IKK), et les voies des MAPKs (P38, JNK, ERK). Ainsi, il y aura activation des facteurs de transcription NF- κ B (nuclear factor kappa B) et AP-1 (activating protein-1). L'IL-1Ra ressemble aux IL-1 α et IL-1 β , il forme un antagoniste de ces cytokines par sa liaison au récepteur IL-1RI et bloque ainsi la transduction du signal. Le récepteur IL-1RI présente une affinité plus grande pour IL-1 α et IL-1Ra que pour IL-1 β , alors que le récepteur IL-1RII présente une affinité plus haute pour IL-1 β que pour IL-1 α et IL-1Ra (67, 69, 70, 71).

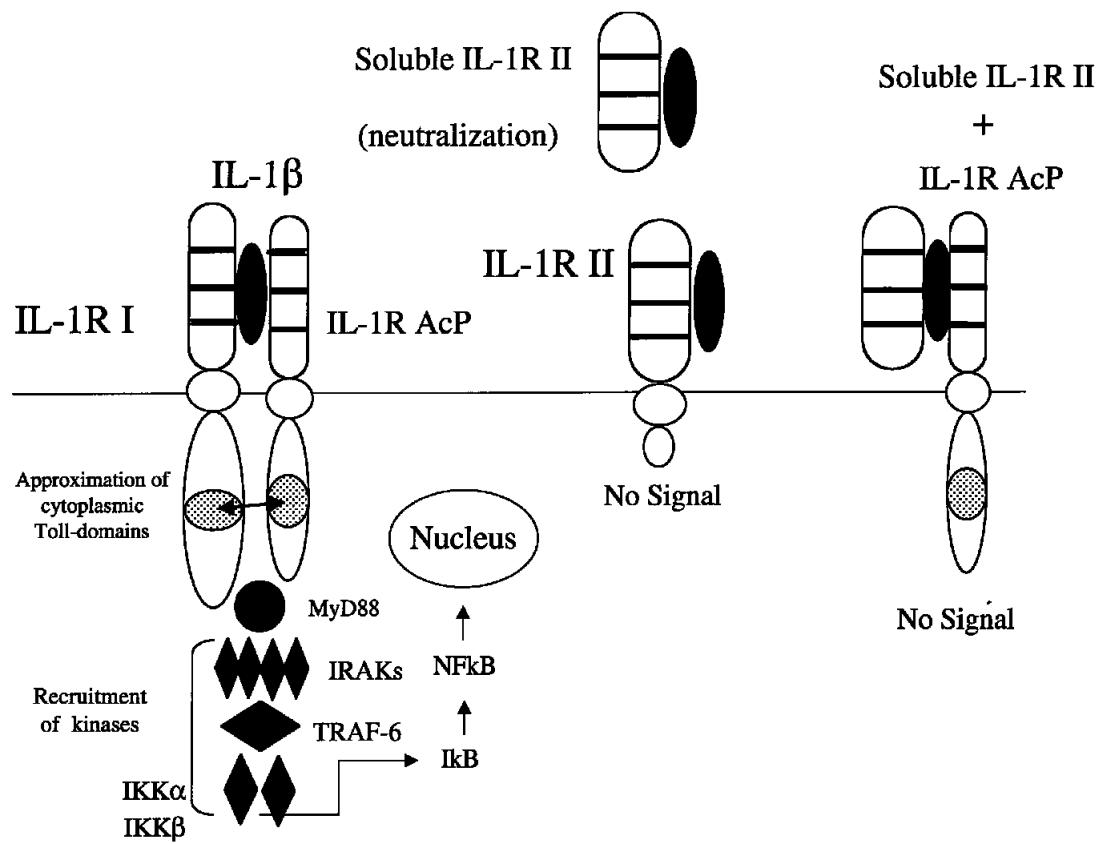


Figure 6: Représentation schématique des récepteurs de l'IL-1 et sa voie de signalisation (72).

8.2 LE *TNF- α*

Le *TNF- α* est une cytokine pro-inflammatoire puissante considérée comme un facteur clé dans certaines maladies. C'est une protéine soluble active de 17 kDa issue de son précurseur transmembranaire active (26 kDa) tmTNF par l'action de l'enzyme convertase métalloprotéique TACE (TNF-alpha-converting enzyme). Le TNF est sécrété principalement par les macrophages (73) et par plusieurs types de cellules telles que : les lymphocytes T, les granulocytes, les cellules NK (natural killer), les neurones, les fibroblastes, les kératinocytes et les cellules musculaires lisses (74).

La famille de TNF comporte plusieurs protéines dont l'une et l'autre peuvent se ressembler par quelques parties de leur structure (75). Ainsi on peut avoir : le *TNF- α* , *TNF- β* , CD40 Ligand, EDA-A1 (ectodysplasin ligand A1), EDA-A2 (ectodysplasin ligand A2), APRIL (a proliferation-inducing ligand), TRAIL (TNF-related apoptosis ligand), TRANCE (TNF-related activation-induced cytokine), TALL-1 (TNF-and apoL-related leukocyte-expressed ligand), Fas Ligand, VEGF, CD30 Ligand, CD27 Ligand, BAFF (B cell activating factor belonging to the TNF family), THANK (TNF homologue that activate apoptosis NF κ -B and C-jun Kinase), BlyS (B lymphocyte stimulator), zTNF4 et TALL-2. Le *TNF- β* forme une famille de TNF nommée la famille des lymphotoxines (*LT α*) : *LT α 3*, *LT α 1 β 2*, *LT α 2 β 1* (74).

Le TNF possède deux types de récepteurs, le récepteur de TNF de type I TNFRI (p55 ou CD120a) et le récepteur de type II TNFRII (p75 ou CD120b); ce sont des récepteurs glycoprotéiques transmembranaires (76) contenant des domaines CRD dans la partie extracellulaire. Les autres membres de la famille de TNF possèdent aussi des récepteurs qui sont reconnues tels que le Fas-R, BAFF-R, EDA-R (75), DR4/TRAIL-R1, DR5/TRAIL-R2 (77).

Le tmTNF et la forme soluble du TNF (sTNF) peuvent se lier à ces deux types de récepteur. Le sTNF possède plus d'affinité pour le récepteur TNFRI. Certains récepteurs de TNF possèdent dans leur partie intracellulaire un domaine appelé DD (Death domain) qui

recrute plusieurs protéines dont certaines initient la voie de signalisation et l'induction de l'apoptose et certaines autres induisent l'activation et la survie cellulaire. Une de ces protéine est la protéine adaptrice TRAF, qui lors de son recrutement au récepteur TNFRI va activer les facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 et induire alors les voies anti-apoptotiques (78). Alors que d'autres protéines comme les protéines adaptrices FADD (Fas Associated protein with Death Domain), le RIP (receptor-interacting protein) (79), et la pro-caspase-8 vont former un complexe appelé DISC (death-inducing signaling complex) et se recruter au récepteur avec une autre protéine adaptrice TRADD (TNF receptor-associated DD) pour déclencher la voie apoptotique (80), ceci est fait par des interactions au niveau d'un domaine appelé DED (death effector domain) qui se trouve au niveau de ces protéines adaptrices. (81)

Le TNF possède plusieurs rôles importants dans la régulation de la réponse immunitaire, son action rentre dans la production des cytokines, le développement des lymphocytes B et T et leur activation (82). Le TNF est aussi un facteur principal dans la médiation de la cytotoxicité (83) et l'apoptose des cellules (84) (78). En plus, plusieurs maladies montrent une activité importante de TNF, ce qui mène à la progression de ces maladies ainsi que la maladie de Crohn's, RA (dégradation de l'ECM et ostéoclastogenèse) (73) (76), le cancer (78) (85), et les troubles des maladies hématologiques (81).

8.3 IL-1 et TNF- α dans la pathogenèse d'OA

L'IL-1 β et le TNF- α sont deux promoteurs essentiels de la pathogenèse d'OA. Ils possèdent beaucoup d'effets destructifs (86). Leur action se fait d'une façon autocrine, paracrine, ou bien par contact direct des cellules (87). Lors de l'OA, l'IL-1 β et le TNF- α augmentent le catabolisme du cartilage et cela en stimulant la production des enzymes protéolytiques par les chondrocytes (Fig.7). Ces enzymes (MMPs, ADAMTS) stimulent alors la destruction du cartilage par la dégradation des composants de l'ECM, principalement l'agrécan et le collagène type II (88) (89). Plusieurs études ont montré l'augmentation du taux de TNF- α et l'IL- β dans le liquide synovial, la membrane synoviale, et le cartilage OA (90) (91) (92).

Ainsi, il est trouvé que chez des patients OA, l'IL-1RI était fortement exprimé dans les chondrocytes et les cellules synoviales (93). Alors qu'il y avait une diminution de la production de l'antagoniste (IL-1Ra) (94) qui bloque l'action de l'IL-1 β , à cause de l'augmentation de la production de l'oxyde nitrique dans les tissus OA (60).

En plus, l'IL-1 β stimule la production d'autres cytokines principalement le TNF- α et l'IL-8 ce qui va entraîner l'initiation et la progression de l'inflammation. Ceci est vu par la présence d'un grand nombre des cellules T dans les tissus synoviales (95). D'autres part, IL-1 β et TNF- α inhibent la production des composants du cartilage (les agrécanes, les collagènes, et autres). Cela apparaît par la présence d'une concentration élevée des fragments de GAGs dans le liquide synovial des patients OA (96). Ainsi, l'IL-1 β peut inhiber l'expression de l'enzyme β -1,3-glucuronyltransférase I (GlcAT-I) responsable de la synthèse des GAGs qui lient les agrécanes (97).

En plus, par l'action de l'IL-1 β et TNF- α , plusieurs facteurs inflammatoires apparaissent lors de l'OA comme l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), le cyclooxygénase 2 (COX-2), la prostaglandine E synthase microsomale (mPGE) et le phospholipase A2 (sPLA2); ces facteurs peuvent contribuer à des changements au niveau des chondrocytes, ainsi que d'autres produits tels que l'oxyde nitrique (NO) et la prostaglandine E2 (PGE2) (94) (98). Ces produits induisent la dégradation du cartilage et la production des enzymes protéolytiques (26), et l'apoptose des chondrocytes (99). Ainsi, l'IL-1 β et le TNF- α activent la voie apoptotique des chondrocytes par la production des PGE2 et l'activation des caspases (caspase-3, caspase-8) (100). Ces cytokines mènent alors à l'activation du mécanisme d'autophagie qui conduit à l'apoptose des chondrocytes d'une façon indépendante des caspases. Cela est fait par l'action des protéinases lysosomiales (cathepsines B et D) qui dégradent les matériaux de la cellule (101). Ces protéinases augmentent ainsi les corps apoptotiques contenant des phosphatases alcalines et des pyrophosphohydrolases nucleoside triphosphates (NTP) qui causent la précipitation du calcium. La calcification du cartilage commence alors à se progresser (102).

Certains facteurs comme l'IL-17 et l'IL-18 augmentent l'expression de l'IL-1 β contribuant ainsi à la progression de la pathogenèse d'OA. Ils augmentent encore d'autres facteurs tels

que l'IL-6, la stromelysine (MMP-3), l'iNOS et le COX-2 dans les chondrocytes du cartilage humain. Une autre voie de signalisation induit encore l'OA par la stimulation de l'IL-1 β et des enzymes protéolytiques (MMPs et ADAMTS); c'est la voie de Wnt- β -caténine (103) (104).

8.4 Thérapies

Plusieurs études ont concentré sur le traitement de l'OA par le blocage des IL-1 β et TNF- α . L'IL-Ra et le récepteur IL-1RII peuvent bloquer le signal induit par l'IL-1 β , puisque l'IL-Ra est un antagoniste du récepteur type I de l'IL-1 β comme c'est déjà mentionné, et puisque le récepteur IL-1RII ne possède pas le domaine TIR nécessaire pour la signalisation et possède plus d'affinité pour l'IL-1 β . Ce qui va entraîner des effets anti-inflammatoires (105). Le récepteur SIGIRR (Single Ig IL-1-related receptor) est un récepteur de l'IL-1 qui bloque le TIR et inhibe donc l'initiation du signal (106). Des anti-TNFs sont encore utilisés pour bloquer la signalisation par le TNF- α . Des nouvelles thérapies s'appuient sur l'inhibition de certains facteurs induisant l'apoptose comme l'iNOS, les caspases, et l'inhibition des voies de signalisation telles que la voie de NF- κ B, et la voie des MAPKs. Des thérapies s'appuient encore sur l'inhibition des enzymes convertases ICE et TACE qui clivent les pro-IL-1 β et pro-TNF- α respectivement en IL-1 β et TNF- α actives (107). Alors que d'autres se reposent sur l'inhibition des enzymes métalloprotéinases (MMPs, ADAMTS) par l'utilisation des inhibiteurs TIMPs. Ce qui va entraîner la diminution de l'activité de ces enzymes. D'où la prévention de la destruction des cartilages articulaires (59).

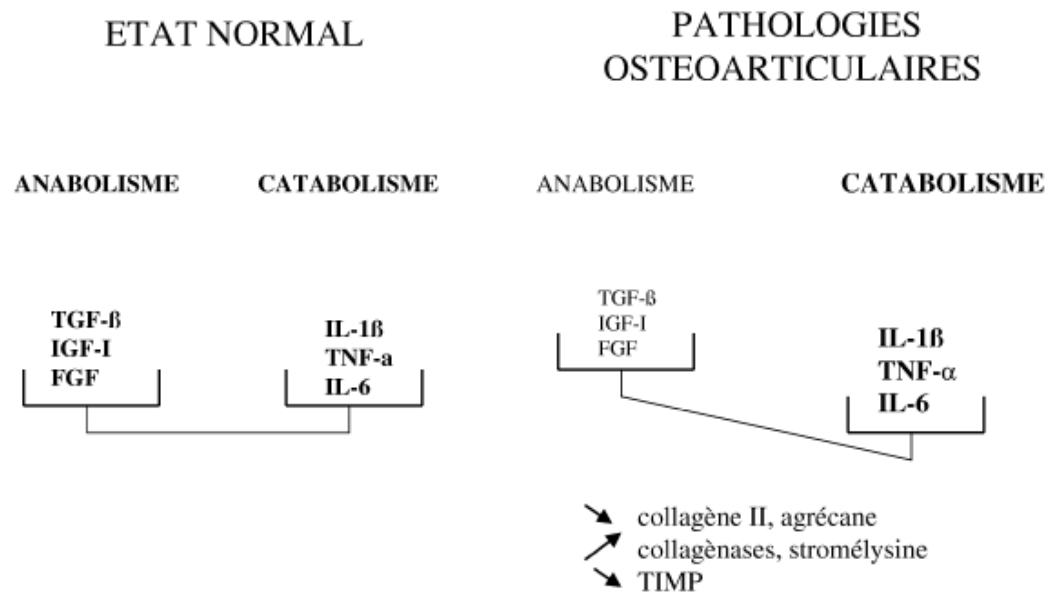


Figure 7: Régulation du métabolisme cartilagineux par les cytokines et les facteurs de croissance au cours de la pathologie dégénérative du cartilage (20).

9. Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK)

Les MAPKs constituent plusieurs voies de signalisation qui peuvent être initiées en réponse aux différents stimuli extracellulaires comme le stress, les facteurs de croissance (108), et les cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF- α) (109). La MAPK peut être activée au niveau des chondrocytes par des fragments de fibronectine (110, 111, 112), des intégrines (110), l'IL-17 (113), le ROS (114), le PGE2 (115), le VEGF (116), et l'ATP extracellulaire (adenosine-5'-triphosphate) (117). Elle fait partie de la famille des sérines/thréonines kinases (118). La MAPK comporte trois groupes principales : la cascade des ERKs (extracellular regulated protein kinase), la cascade des SAPK/ JNK (stress-activated protein kinase/c-Jun amino-terminal kinase), et la cascade des p38 kinases (108). Ainsi, un autre groupe est récemment trouvé dans la famille des MAPKs. Ce groupe est présenté par la protéine ERK5 MAPK, cette protéine joue un rôle dans la prolifération et la survie cellulaire (135).

Cette voie consiste en plusieurs phosphorylations des protéines (108). Cela mène après à la phosphorylation de certains facteurs de transcription comme NF- κ B, SMAD, STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription protein), NFAT (Nuclear factor of activated T-cells), et Wnt. Ces facteurs seront activés, d'où certains gènes cibles seront exprimés pour avoir une réponse biologique (119). L'activation de la MAPK se fait par deux étapes et comporte trois modules de protéines: la MAPK kinase kinase (MAP3K), la MAPK kinase (MAP2K), et la MAPK (120). La première étape consiste en une phosphorylation d'une kinase qui possède une double spécificité appelée la MAP2K (ou la MAP/ERK kinase (MEK) ou MKK), par la MAP3K. La deuxième étape se fait par la phosphorylation de la MAPK par les MKKs d'où la MAPK sera active (121). Cette phosphorylation se fait par l'addition d'un groupe phosphate sur le résidu Ser ou Thr (108, 121). Il y a 12 MAPKs, 7 MKKS, et 14 MKK kinases qui ont été identifiées (123, 124, 125). Les MAPKs possèdent des motifs conservés ayant la séquence Thr-X-Tyrosine (Tyr) d'où le X donne la spécificité de chaque famille appartenant aux MAPKs : l'acide aminé X chez l'ERK est

l'acide glutamique d'où la séquence sera Thr-Glu-Tyr. Chez le p38 MAPK, l'acide aminé X est une glycine d'où la séquence sera Thr-Gly-Tyr. Et finalement chez le JNK, l'acide aminé X est une proline (Pro) d'où la séquence devient Thr-Pro-Tyr. (121)

Les MAPKs régulent plusieurs activités cellulaires ainsi que le développement, la différenciation et la prolifération cellulaire et l'apoptose (126, 127, 128). Ainsi que dans le cartilage, ces MAPKs jouent plusieurs rôles dans le développement, l'activation, la prolifération et l'apoptose des chondrocytes (129). Les MAPKs sont impliquées dans plusieurs maladies rhumatismales. Elles jouent un rôle important dans la maladie auto-immune (RA) par la régulation de la production des cytokines pro-inflammatoires menant ainsi à la destruction du cartilage et la progression de l'inflammation (130). Ainsi que lors d'une OA, les MAPKs jouent un rôle dans la dégradation du cartilage par la production des ADAMTS et des MMPs (122) (131) (Fig.8).

9.1 ERK (extracellular signal-regulated protein kinase)

L'ERK est l'une des voies de signalisation appartenant au MAPK. Elle possède plusieurs isoformes (ERK 1, 2, 3, 4, 5, 7). L'ERK1 et l'ERK2 sont les plus exprimées, elles sont connues sous le nom p44/p42 MAPK. La voie de p44/p42 MAPK peut être activée par des facteurs de croissance, des cytokines, des infections virales, et des agents carcinogènes. Cette voie dépend de plusieurs protéines qui entrent dans l'activation de l'ERK1/2, ainsi que les protéines Raf (c-Raf1, B-Raf, A-Raf) qui sont activées par le proto-oncogène Ras. La cascade commence par la petite protéine G (GTP-binding) Ras qui assure la liaison entre les récepteurs membranaires tyrosines kinase et les différents composants de cette cascade. Ras entraîne l'activation de Raf et sa translocation de la membrane vers le cytoplasme, Raf alors va activer MEK1/2 (MKK1 et MKK2) qui par la suite active L'ERK1/2 (124). ERK1/2 activent plusieurs facteurs de transcription tels que le facteur de transcription c-Myc (myelocytomatosis) (132), Elk-1 (E Twenty-six-like transcription factor 1) et la famille de l'AP-1 qui contiennent les facteurs c-Jun, c-Fos, (121), l'ATF-2 (activating transcription factor 2) (133) et des substrats autres que les facteurs de transcription comme

le cPLA2 (134). Certains de ces facteurs de transcription peuvent réguler plusieurs gènes impliqués dans l'inflammation, la production des enzymes protéolytiques, et la régulation de la prolifération des cellules lors de la maladie OA (132). Des études ont montré que des perturbations au niveau de cette voie (au niveau des protéines Raf) entraînent la mort chez les souris; alors qu'une déficience en ERK1 chez des souris entraîne une réduction de l'expression des récepteurs des cellules T (α et β), d'où le rôle de l'ERK dans l'activation des cellules T, et donc dans l'inflammation (121). En plus, l'ERK joue un rôle dans les cancers. Des mutations qui convertissent la Ras en un oncogène active entraînent la prolifération des tumeurs. Encore, les ERKs ont des rôles dans le système nerveux central, et la mémoire (124), ainsi que dans le développement et l'hypertrophie cardiaque (135). Au niveau du cartilage, la p44/42 MAPK induit l'expression du collagène type II (124) (136). La p44/42 MAPK induit encore l'expression des mPGEs dans les chondrocytes OA (137). Ainsi, une étude a montré que l'inhibition de l'ERK par un inhibiteur spécifique (PD198306) entraîne la réduction de la destruction du cartilage, la diminution de la largeur des ostéophytes, et une diminution de l'inflammation synoviale dans un modèle expérimental de l'OA développé chez le lapin (138).

9.2 P38 MAPK

La protéine p38 MAPK est un « sensor » du stress cellulaire. Elle est formée de quatre isoformes : p38 MAPK- α (139), - β (140), - γ (141), et - δ (142) qui possèdent 60% d'homologie (143). Dans les cellules inflammatoires, la forme p38 α est la plus exprimée (121). La p38 MAPK a été identifiée pour la première fois comme une kinase activée en réponse aux lipopolysaccharides (LPS) bactériennes (144). Les p38 MAPKs sont activées par plusieurs stimuli extracellulaires telles que les cytokines (IL-1, IL-2, IL-7, IL-17, IL-18, TGF- β et TNF- α), et quelques pathogènes ou leurs produits (LPS, Staphylococcal peptidoglycan, Staphylococcal enterotoxine B, echovirus 1, et Herpes simplex virus 1) (143). L'IL-1, le TNF- α (145), et les LPS (139) sont les stimuli inflammatoires majeurs induisant les p38 MAPKs. Ainsi, elles sont activées dans les cellules immunitaires par les

cytokines pro-inflammatoires d'où l'importance de leur rôle dans la réponse inflammatoire. Les hormones, les ligands des récepteurs à protéine G, (124) et les stress comme des chocs osmotiques dans différents cellules (fibroblastes, cellules épithéliales et endothéliales) (146), des chocs thermiques (les protéines de choc thermiques HSP), l'ultraviolet, et des états hypoxiques (143) activent aussi la p38 MAPK, ainsi que des facteurs de croissance comme GM-CSF, l'érythropoïétine (147), FGF et l'IL-3 déclenchent encore l'activation du p38 MAPK dans certaines cellules (148). La p38 MAPK est activée par MEK3, 4, et 6 (149), ce qui mène à l'activation de certains facteurs de transcription tels que l'ATF-2, le MEF2 (Myocyte enhancer factor), le NF- κ B (150), l'ATF-1, l'Elk-1, le SRF (serum response factor), le CHOP 10 ou GADD 153 (growth arrest and DNA damage inducible gene 153) (148) (151, 152, 153, 154, 155, 156) Le SB203580 est un inhibiteur de p38 (α et β) (150) qui diminue l'activation de NF- κ B (157)(158).

Comme beaucoup d'autres voies de signalisation, les p38 MAPKs sont incluses dans la croissance et la différenciation cellulaire, l'inflammation, et l'apoptose. La P38 MAPK joue des rôles dans des différentes maladies telles que l'asthme, l'auto-immunité (137), les réponses immunitaires par l'activation des leucocytes (159) et des neutrophiles (160) (161), et l'hypertrophie cardiaque (162). Dans les tissus OA, la phosphorylation de la p38 MAPK est plus élevée que dans des tissus normaux (163). Les deux voies ERK et p38 inhibent l'expression des agrécanes dans le cartilage OA (164). Une étude a montré l'activation de la p38 MAPK au niveau d'un ménisque rompu (165). Une autre étude a montré que l'activation de la p38 MAPK est nécessaire pour la production des MMPs dans les fibroblastes synoviales OA (166).

9.3 C-jun N terminal kinase (JNK)

La protéine JNK est connue comme une protéine activatrice du stress cellulaire (167). Elle a été la première protéine kinase identifiée dans la phosphorylation du facteur de transcription c-Jun par l'activation de son domaine amino-terminal (au niveau Ser 63 et Ser 73) dans des cellules exposées à des radiations UV (168). JNK possède trois isoformes :

JNK1, JNK2, et JNK3 (169). Un autre groupe kinase induisant fortement le stress a été identifié sous le nom de SAPK 1α , β , γ (167). Pour cela ils ont proposé que ces deux groupes de kinases sont les mêmes d'où leur nom JNK/SAPKs (170). La protéine JNK est activée par MKK7 et MKK4 qui sont ainsi activées par le groupe MEKK (MEKK 1-4) (171). Alors, JNK active par son tour plusieurs facteurs de transcription tels que les facteurs appartenant à l'AP-1, essentiellement le c-Jun (172, 173) et l'ATF-2 (174), ainsi que d'autres facteurs comme l'Elk-1, et le Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) (175) (176) (177). La voie de JNK est incluse dans la régulation de la prolifération cellulaire (121) et l'apoptose (178), la migration cellulaire, la régulation des gènes, la régulation du signal de l'insuline, et les fonctions neuronales (179). JNK joue des rôles importants dans le cancer (137), le RA (180), la réponse immunitaire (121), dans la différenciation des cellules T helper (181), dans l'accident vasculaire cérébral, l'inflammation (121), et les maladies cardiaques (135). Dans la pathologie d'OA, la protéine JNK est activée par plusieurs stimuli tels que les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 et TNF- α) (129), et les fragments de fibronectines (112). JNK active l'expression de COX-2 (182, 183) et la MMP-13 (184) dans les chondrocytes. JNK est plus activée dans des tissus OA d'un chien que dans les tissus normaux (185). SP600125 inhibe l'expression des JNK 1, 2, et 3 (180).

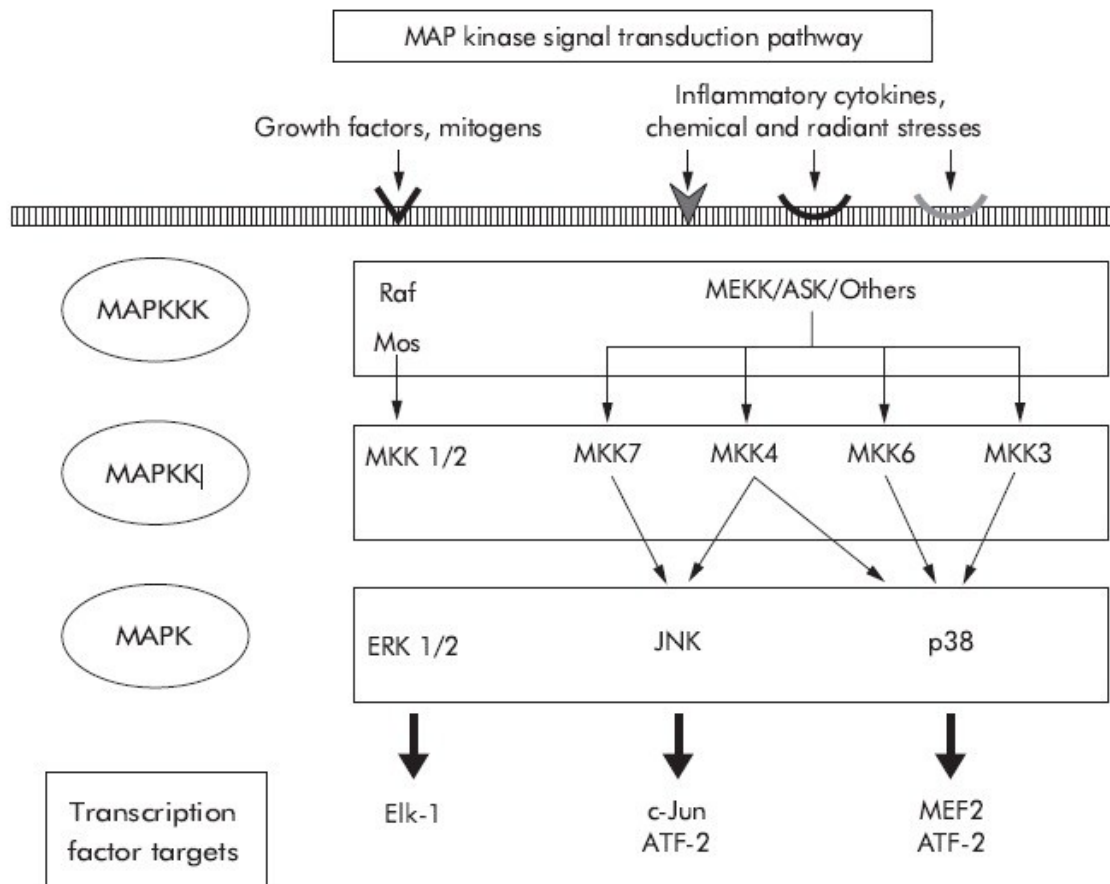


Figure 8: Le résultat de la phosphorylation des différents isoformes des MAP-Kinase est l'activation des trois principales familles : ERK, JNK, et p38 MAP kinase qui activent différents facteurs de transcription (121).

10. La protéine AKT

L'AKT est une protéine kinase sérine/thréonine appelé aussi PKB (protein kinase B) (186). Elle régule la survie cellulaire. Elle est stimulée par les facteurs de croissance, les cytokines, l'oncogène Ras, (187, 188,189) et les fragments de fibronectine (190). AKT possède trois formes: AKT1/PKB α , AKT2/PKB β , et AKT3/PKB γ (191), ces formes-là possèdent des domaines ayant la même structure tels que : le domaine N-terminal plekstrin homology, un domaine de liaison, un domaine kinase central, et un domaine C-terminal (192). L'AKT est activée par la voie de PI3K (193). Cette activation se fait par la phosphorylation des deux résidus au niveau du domaine kinase et du domaine C-terminal, respectivement : la Thr (au niveau 308) phosphorylée par la phosphatidylinositol-dépendent kinase 1 (PDK1) et la Ser (au niveau 473) phosphorylée par le mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex-2). L'activation de l'AKT mène à la phosphorylation de plusieurs protéines, (194, 195) ainsi l'AKT est l'un des voies stimulant le facteur NF- κ B (196) qui joue un rôle important dans la destruction du cartilage et l'inflammation (197). En plus, l'AKT régule aussi plusieurs autres facteurs de transcription tels que l'E2F (198), le CREB (cAMP response element-binding) (199), et le Daf-16 (membre de la famille des FOXO) (200). La voie de PI3K/AKT est une voie importante dans la régulation de l'immunité et de l'inflammation, ainsi que dans le cancer où les différentes formes d'AKT régulent plusieurs processus cellulaires et cela en induisant la tumeur dans les différents stades (194).

11. La protéine P70 S6 Kinase

La p70 S6 est une protéine kinase ribosomale de 70 kDa (202). Elle comporte deux membres : la p70 S6K1 (203) et la p70 S6K2 (204). Ce sont deux sérine/thréonine kinases ayant une homologie très élevée au niveau des acides aminés, ainsi qu'au niveau du domaine C-terminal (205). Quelques différences dans les régions N-terminal et C-terminal donnent d'importance dans la régulation de ces deux kinases (206). p70 S6K est activée en réponse aux facteurs de croissance, cytokines, et des nutriments. L'activation de S6K se fait par la phosphorylation des résidus sérine/thréonine dans la région C-terminale ce qui mène à la phosphorylation d'un site appelé 'activation Loop' ou T-Loop (T229 dans le p70S6K1, et T228 dans le p70S6K2) par le PDK-1 (207, 208). Ainsi l'action de la p70 S6K est incluse dans différents processus cellulaires tels que : l'initiation de la traduction et l'élongation au cours de la synthèse des protéines (209) (210), la prolifération cellulaire (211), la transcription (212), et la croissance cellulaire (213). Le P70 S6K joue des rôles importants dans différentes pathologies ainsi que dans le diabète, l'obésité (214), et le cancer (215). Des études ont montré que la Rapamycine inhibe l'activation de la voie de p70 S6K (216).

12. La Rapamycine

La Rapamycine (ou sirolimus) est un agent immunosuppresseur et un ancien médicament qui possède des propriétés antifongiques (217) et anti-tumeurs (218). Son nom (Rapamycine) provient lors de l'isolation d'un échantillon du sol provenant du nui de Rapa (219). Ce produit est connu lors de la transplantation par son action de prévention du rejet de la greffe et cela par la suppression du système immunitaire (220). Son mécanisme d'action consiste en l'arrêt cellulaire dans plusieurs types de cellules cancéreuses tels que les neuroblastomes, les glioblastomes, (221, 222), l'ostéosarcome (223), le cancer pancréatique (224), le cancer de la prostate et du sein (25), (225), la leucémie et les cellules

B lymphoma (226,227). La Rapamycine est un inhibiteur de la voie de signalisation mTOR (mamalian target of Rapamycin) qui est incluse dans la croissance et la prolifération cellulaire, l'angiogenèse et le métabolisme. Ainsi, cette inhibition cause la diminution de la synthèse protéique, ainsi que le blocage de la prolifération et la différenciation des cellules T (228, 229). La p70 S6K est une autre voie de signalisation affectée par l'action de la Rapamycine. L'inhibition de cette voie entraîne le blocage de la traduction des protéines et l'élongation d'où l'inhibition de la synthèse protéique. Plusieurs maladies peuvent avoir la Rapamycine comme traitement telles que les maladies auto-immunes, l'allergie, et les maladies inflammatoires (228).

13. Hypothèse de la recherche

13.1 Objectif de la recherche

Les ADAMTS présentent une famille de protéases qui jouent un rôle très important dans la dégradation du cartilage articulaire lors de la pathologie d'OA, et ceci par la dégradation des PGs (agrécanes) et du collagène type II qui constituent les constituants principaux du cartilage. Le but de cette recherche est d'étudier l'action d'un agent immunosuppresseur (Rapamycine) sur l'expression du gène ADAMTS-4 qui est induit par les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF- α dans les chondrocytes humains.

13.2 Hypothèse

La structure de l'ECM comporte plusieurs composants qui servent à maintenir la rigidité du cartilage articulaire, et qui lui confèrent aussi une protection contre plusieurs facteurs de risque intérieurs ou extérieurs. Lors de l'OA, plusieurs altérations touchent le cartilage articulaire menant ainsi à la progression de cette maladie et à la destruction de ce cartilage. Plusieurs études ont montré comment ce mécanisme ostéoarthritique se progresse, et cela en étudiant les différentes voies et les différents facteurs qui amène à la dégradation des composants principaux de l'ECM (les collagènes, les PGs, les agrécanes). Il est déjà démontré que les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF- α sont des facteurs très importants dans la progression de l'OA, et que ces deux cytokines induisent plusieurs voies de signalisation. À ce temps, les études de plusieurs inhibiteurs, qui peuvent bloquer ces voies entraînant l'inflammation et l'augmentation de la synthèse des enzymes protéolytiques, sont augmentées. Notre hypothèse est de démontrer le mécanisme d'action d'un agent pharmacologique inhibiteur au niveau des chondrocytes articulaires et d'étudier son intervention sur les différentes voies cataboliques. On a montré que la Rapamycine peut inhiber l'expression de l'ADAMTS-4 induit par l'IL-1 β et le TNF- α et cela par le blocage

de certaines voies de signalisation ainsi que la voie des MAPKs, la voie de p70 S6K, et la voie de l'AKT.

Chapitre II :

Matériaux et Méthodes

1. Culture cellulaire

Des cellules chondrocytes NHAC (normal human articular chondrocytes) du passage 4 (Cambrex, Walkersville, MD) conservées dans l'azote liquide et prélevées du cartilage du genou d'un homme de 50 ans ont été cultivées dans des milieux de culture en monocouches, à haute densité, et à court terme. Plusieurs passages ont été faits pour obtenir des cellules de passage 5 et 6. Ces milieux de culture DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) sont complétés avec 10% du sérum fœtal du bovin (FBS), 1% de la pénicilline streptomycine (PS), et 0.2% du Fungizone (F). Les cellules ont été distribuées dans des plaques de culture cellulaire stériles contenant 6 puits, et ont été cultivées jusqu'à qu'elles seront confluentes. Après, ces milieux ont été enlevés et remplacés par du milieu DMEM contenant 2.5% du FBS, 1% de la PS et 0.2% du F pendant 24 h. Les cellules ont été traitées avec de la Rapamycine (10, 20, 40 μ M) pendant 30 min, puis stimulées avec l'IL-1 β et le TNF- α (R&D systems) en présence de la rapamycine ou non; les extractions sont faites après 24 h. Les effets de la Rapamycine sur l'expression de l'ARNm d'ADAMTS-4 ont été étudiés par RT-PCR, l'activité enzymatique a été mesurée par la technique d'ELISA, ainsi que des diverses voies de signalisation ont été étudiées par le Western blot. La Rapamycine était diluée dans le méthanol ainsi que tous les contrôles ont été traités par le méthanol (61).

2. Extraction des ARN totaux et analyse RT-PCR

2.1 Extraction des ARN totaux

Les chondrocytes traités avec la Rapamycine et stimulés avec l'IL-1 β (10 ng/mL) et le TNF- α (20 ng/mL) ont été utilisés pour l'extraction. Les milieux de culture (2.5% FBS) ont été enlevés et conservés à part dans le congélateur pour être utilisés après pour la mesure de

l'activité enzymatique par ELISA. Les cellules ont été traitées pendant 5 min, par la solution D contenant du Guanidinium Thiocyanate (4.0 M), Citrate de Sodium (25mM), de la Sarcosyle (0.5%), et de la mercaptoéthanol (0.1M), complétée avec de l'eau stérile dépourvue de la RNase. Les cellules ont été grattées et transférées dans des tubes (1.5 mL) contenant de l'acétate de sodium et du chloroforme. La solution eau-phénol saturé a été ajoutée à ces tubes. Puis le mélange a été agité et laissé dans la glace pour 10 min, puis centrifugé pendant 20 min à 4 degré C et à la vitesse 14,000 rpm. Après, les surnageants ont été pris de chaque tube et mis dans d'autres tubes contenant de l'isopropanol, agités et gardés à -20 degré C jusqu'à lendemain. Les tubes ont été centrifugés à 14,000 rpm pendant 20 minutes à 4 degré C puis décantés par inversion. De la même façon, les ARNs totaux ont subi une deuxième précipitation par l'isopropanol et la solution D, gardées jusqu'au lendemain, centrifugées après et décantées par inversion. L'éthanol (70%) a été ajouté aux ARNs totaux, puis les tubes ont été centrifugés et décantés par inversion et gardés sous la hotte à la température de la pièce pendant une heure pour se sécher (62).

2.2 Mesure de la concentration des ARNs

20 µL de l'eau traitée au DEPC (Diéthylpyrocarbonate) ont été ajoutés aux tubes séchés. Ces tubes ont été alors vortexés et centrifugés brièvement et chauffés à 68 degré pendant 5 minutes trois fois, puis centrifugés à 14,000 rpm pendant 3 minutes à 4 degré C.

5 µL de chaque tube est pris et ajouté dans 495 µL d'eau autoclavée et les densités optiques (D.O) sont mesurées à 260 nm par la spectrophotométrie BECKMAN DU-600, et les concentrations sont obtenues en µg/mL. Pour un volume final de 12.5 µL, 2 µg d'ARN total de chaque tube ont été mélangés avec de l'eau autoclavée, et les mélanges sont gardés dans des tubes (0.5 mL) dans la glace pour faire le RT-PCR.

2.3 RT-PCR semi-quantitatif (Reverse Transcriptase-polymerase Chain Reaction)

Les ARNs déjà isolées sont incubés à 80 degré C pendant 5 minutes pour dénaturer les ARNs puis placés immédiatement dans la glace. Le mélange du reverse transcriptase (RT-Mix) est ajouté aux tubes dans la glace, puis ces tubes sont incubés à 42 degré pendant 1 h

10 min. le RT-Mix est déjà préparé, il contient: MMLV-RT (200U/ μ L) (invitrogen), RNasin (400U/ μ L) (pharmacia), 5X MMLV-RT Buffer, Oligo d(T) 12-18mer (0.5mg/m/c), BSA acétylé (1mg/mL)(promega), dNTP mix (10 mM chacun), et DTT. 5 μ L de chaque tube est mis dans un petit tube de PCR. 45 μ L du mélange de réactifs (PCR-Mix) est ajouté à chaque tube pour effectuer le PCR, ce mélange contient : du dNTPs mix (1.25 mM chacun), de l'ampli-Taq DNA polymérase (5 U/ μ L), du DTT, Mg Cl₂, de l'eau stérile, et les amorces spécifiques des gènes étudiés. Ces tubes sont alors placés dans la machine de PCR 'DNA cycler' (Techne, Princeton, NJ). L'amplification est fait comme suit : un cycle à 94 degré pendant 1 min; 35 cycles à 94 degré C pour 1 min, une hybridation à 60 degré C pour 2 min, et une extension pour 3 min à 72 degré C, suivie par un cycle d'extension pour 7 min à 72 degré C (62).

2.4 Électrophorèse sur gel d'agarose

Après que la réaction de PCR est finie, des aliquotes de 16 μ L de chaque tube sont mélangées avec le colorant de l'ADN formé du bleu de bromophénol (1%), du xylène cyarole (1%), du glycérol (80%) et de l'eau. Le gel d'agarose est préparé à 1.4% contenant du tampon TAE 50X (Tris acétate EDTA), et d'éthidium bromide. L'électrophorèse est accomplie à 120 Volt et ensuite l'ADAMTS-4 (692 bp), le glyceraldéhyde phosphate déhydrogénase 'GAPDH' (226 bp), et TIMP-3 (570 bp) ont été détectés par exposition à l'ultra-violet en présence du 100 bp DNA Ladder (1 μ g/ μ L) (62). Des contrôles négatifs ont été utilisés durant le RT-PCR, et ces contrôles n'ont pas donnés aucune bande. Les amorces des gènes utilisés durant le PCR sont formées par les séquences suivantes présentées dans le tableau ci-dessous (le symbole F est pour l'amorce 'Forward' et le symbole R est pour l'amorce 'Reverse'):

Nom	Symbole	Concentration	Séquence	F ou R
Aggrecanase-1	ADAMTS-4	0.5 µg/µL	5'ACCACTTTGACACAGCCATTC3'	F
Aggrecanase-1	ADAMTS-4	0.5 µg/µL	5'ACCCCCACAGGTCCGAGAGCA3'	R
Glycèraldéhyde phosphate déhydrogénase	GAPDH	0.5 µg/µL	5'GAAGGTGAAGGTCGGAGTC3'	F
Glycèraldéhyde phosphate déhydrogénase	GAPDH	0.5 µg/µL	5'GAAGATGGTGATGGGATTTC3'	R
Tissue inhibitor of metallo-proteinase	TIMP-3	1 µg/µL	5'GCAGCAGCGGCAATGACC3'	F
Tissue inhibitor of metallo-proteinase	TIMP-3	1 µg/µL	5'CCGGATGCAGGCGTAGTGTTT3'	R

Tableau 1: Composition des différentes amorces d'ADAMTS-4, GAPDH, et TIMP-3.

3. Détermination de l'activité enzymatique de l'ADAMTS-4 par ELISA

Les surnageants collectés des milieux de culture après traitement des chondrocytes par la Rapamycine et la stimulation avec l'IL-1 β et le TNF- α sont utilisés pour mesurer l'activité de l'ADAMTS-4 par la technique d'ELISA selon le protocole du 'sensitive Aggrecanase Activity ELISA' (Cat # SEN-AGG.96, MD Biosciences Inc., St. Paul, MN). L'ADAMTS-4 qui se trouve dans le surnageant clive le domaine inter-globulaire de l'agrécan relâchant ainsi le peptide S ayant la séquence N-terminale ARGSVIL qui est quantifiée pour avoir la courbe standard de l'ARGSVIL (239). Durant l'expérience, l'anticorps utilisé est un anticorps monoclonale anti-peroxidase, et la détection est faite par la solution TMB (3, 3',5, 5'- tetramethylbenzidine) / hydrogène peroxyde après 30 min d'incubation à l'obscurité. L'absorbance est lue à 450 nm et la déviation standard (+ ou – SD) de trois différentes expériences est montrée par les barres dans le graphique fait par le programme GraphPad Prism (61).

4. Détection des protéines par Western blot

Des chondrocytes traités avec la Rapamycine puis stimulés par IL-1 β et TNF- α ont été rincés après aspiration du milieu de culture par le PBS (pH 7.2) plusieurs fois, puis incubées pendant 20 à 30 min sur la glace avec le Lysis Buffer (Tris 62.5 mM (pH 7.5), 1% Triton X-100, 10% glycérol, inhibiteur de protéase, PMSF, DTT (0.1 M), Ortho-vanadate (100 μ M)). Les cellules sont après grattées et les lysats sont transférés dans des tubes. Ces tubes sont après vortexés trois fois puis centrifugés pendant 5 à 10 min à 14,000 rpm. Les surnageants sont récoltés et les concentrations des protéines sont mesurées par la technique de Bio-Rad Protein Assay Kit. Les protéines (15 à 20 μ g) sont mélangées ensuite avec SDS (2%) et mercaptoéthanol (10%), puis chauffées à 95 degré pendant 5 min. Les protéines sont ensuite séparées par SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel

electrophoresis) après qu'on a ajouté le colorant (bromophénole). Des gels de séparation de 8, 10, 12% sont utilisés et le stacking gel est de 5%. L'électrophorèse se déroule en présence du tampon (1X) running buffer (Tris-Base 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0.1%) et du protein Ladder (BenchMark) à 60 V pendant 30 min puis à 100 V pendant 2 à 3 h. Le transfert est fait pour une nuit sur une membrane de nitrocellulose 0.45 μ m (Bio-Rad) en présence du tampon (1 X) transfer buffer (Tris-base 25 mM, Glycine 192 mM) à 30 V. Les membranes sont lavées avec du (1 X) TBS-Tween (Tris-buffered saline-Tween) (0.05%) pendant 10 min puis bloquées pendant 1 h avec 5% du lait sec dans (1X) TBS-Tween (0.05%). Après 1 h, les membranes sont lavées avec (1X) TBS-Tween (0.05%) trois fois puis incubées avec le premier anticorps dilué dans 2% du lait avec TBS-Tween à 4 degré pour une nuit. Les anticorps utilisés sont des anti-phospho-p44/42, anti-phospho-p38 MAPK, anti-phospho-SAPK/JNK, anti-phospho-P70S6K, et anti-phospho-AKT; ainsi que anti-p44/42 totale, anti-p38 MAPK totale, anti-SAPK/JNK totale (Cell Signaling Technology), et le β -actine (Sigma-Aldrich). La dilution utilisée pour les anticorps primaires est 1 :1000. Les membranes sont après lavées trois fois avec le TBS-Tween puis incubées pendant 1 h avec des anticorps secondaires anti-Lapin HRP-conjugated, et anti-Souris HRP conjugated (Promega) dilués dans 2% lait avec (1X) TBS-Tween (0.05%) pour une dilution de 1 :2500. Les membranes sont ensuite lavées trois fois et incubées avec le substrat ECL (BioVision) pendant 1 min pour développer les bandes qui sont visualisées sur le film par autoradiographie. Les membranes sont ensuite lavées avec le TBS-Tween et réutilisées pour la détection des protéines totales (61) (233).

5. Analyse statistique

Les bandes sont scannées à l'ordinateur puis mesurées par le programme NIH 'ImageJ'. Les valeurs obtenues des phosphoprotéines sont normalisées avec celles des protéines totales ou celles des contrôles (GAPDH, β -actine); les valeurs obtenues sont en unité arbitraire. Une représentation graphique montre les valeurs moyennes de deux ou trois expériences; les différents paramètres statistiques ont été testés en utilisant le programme

«GraphPad InStat». Les valeurs moyennes sont calculées avec les erreurs standards (SE) pour chaque cas; la valeur P des expériences a été considérée significative si $P < 0.05$.

Chapitre III:

Résultats

1. Rapamycine inhibe l'expression de l'ARNm ADAMTS-4 induit par IL-1 β et TNF- α .

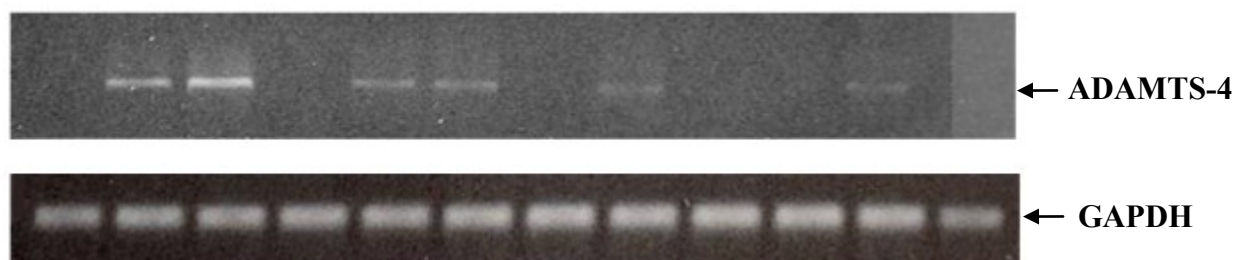
Pour étudier l'impact de la Rapamycine sur l'expression de l'ADAMTS-4, des chondrocytes articulaires humains normaux (NHAC) mis en culture sont traités avec différentes doses de Rapamycine (10, 20, et 40 μ M).

Après, ces cellules sont stimulées par les deux cytokines qui induisent l'expression des protéases (ADAMTS et MMP), l'IL-1 β et le TNF- α ; cela en les mettant dans le milieu de culture toutes seules ou en présence de la Rapamycine.

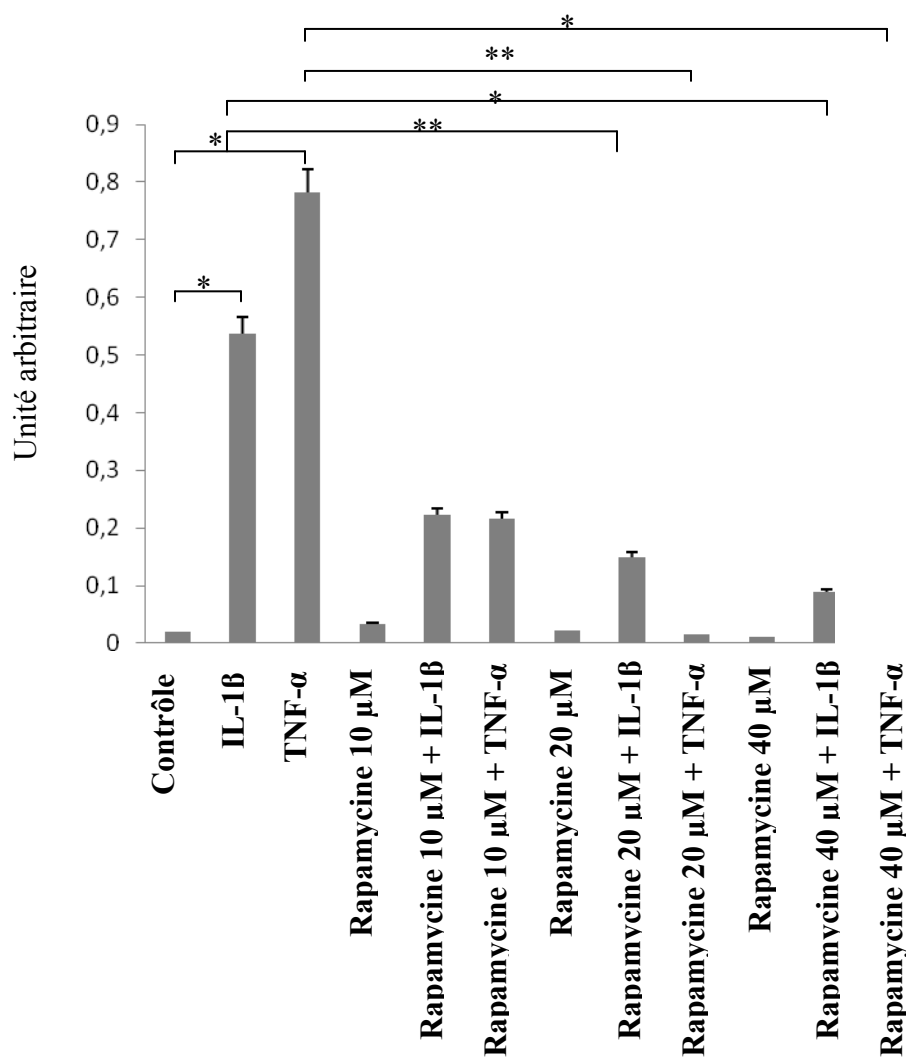
Les effets de la Rapamycine sur l'expression de l'ARNm de l'ADAMTS-4 sont observés par RT-PCR (Fig.9). L'IL-1 β et le TNF- α seuls stimulent fortement l'expression de l'ARNm de l'ADAMTS-4. Le gel d'agarose dans la figure 9-A montre que la Rapamycine inhibe l'expression de l'ARNm de l'ADAMTS-4 induit par les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF- α dans les chondrocytes. Cependant, il semble que la Rapamycine est plus efficace à inhiber l'expression de l'ARNm de l'ADAMTS-4 en présence du TNF- α , puisque le taux d'ARNm de l'ADAMT-4 a baissé plus fortement en présence du TNF- α qu'en présence de l'IL-1 β . Une dose minimale de 10 μ M de la Rapamycine était suffisante pour inhiber l'expression de l'ARNm de l'ADAMTS-4 sans que l'expression du contrôle GAPDH soit affectée. Des doses plus grandes de la Rapamycine (20 et 40 μ M) inhibent plus fortement l'expression de l'ARNm de l'ADAMTS-4; de même comme c'est remarqué, cette inhibition a été plus forte en présence du TNF- α (Fig.9-B).

Pour observer l'effet de la Rapamycine sur l'activité enzymatique de l'ADAMTS-4, le fragment ARGSVIL qui est relâché par le clivage de l'agrécan par l'aggrécanase-1 est mesuré par ELISA. Le graphique montre que le taux d'ARGSVIL est légèrement augmenté par IL-1 β et non pas avec le TNF- α ; cette légère augmentation a été diminuée en présence de la Rapamycine (Fig.9-C).

(A)



(B)



(C)

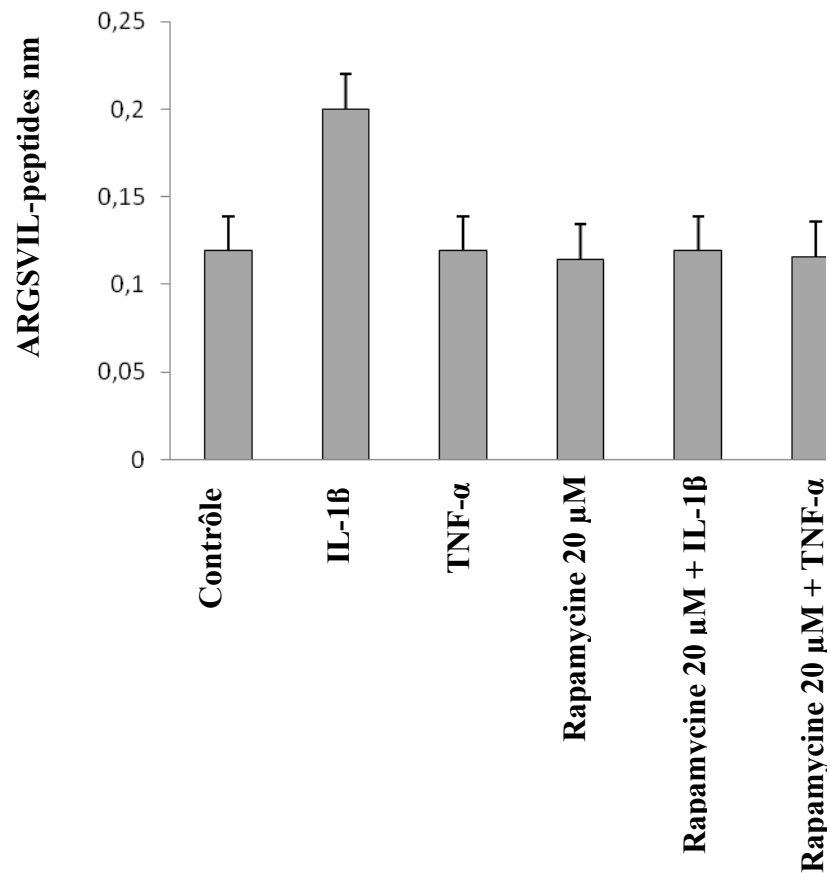
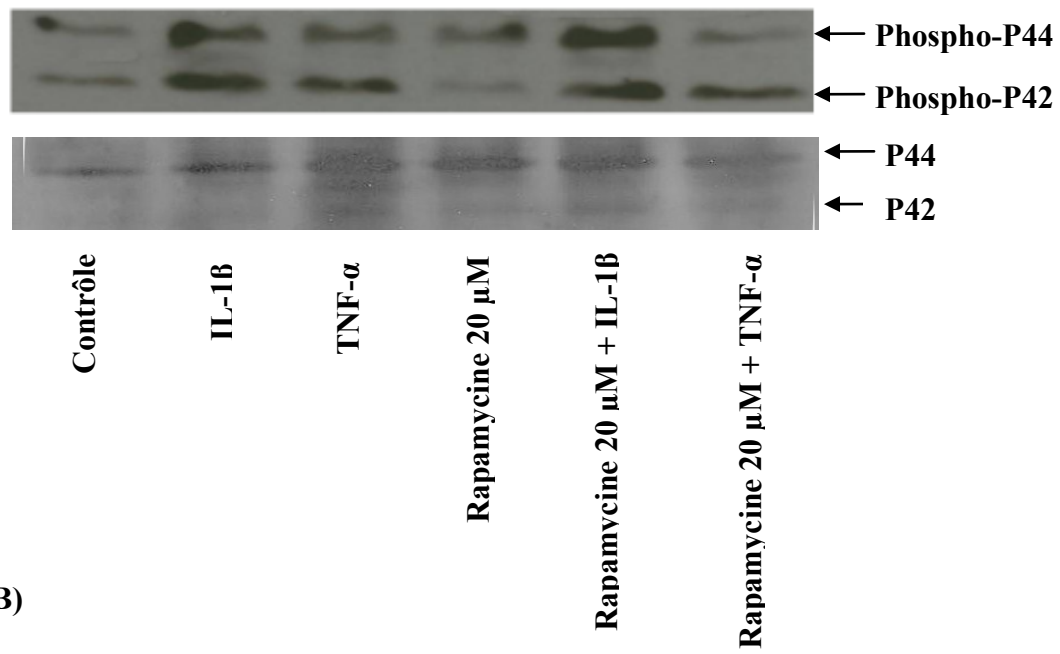


Figure 9: Inhibition de l'expression de l'ARNm de l'ADAMTS-4 induit par l'IL-1 β et le TNF- α (A). Des chondrocytes normales (NHAC) sont traités avec différentes concentrations de la Rapamycine pour 30 minutes suivis par l'induction avec IL-1 β et TNF- α pendant 24 h. Le taux des ARNm de l'ADAMTS-4 mesuré par le RT-PCR est présenté. (B) Les densités des bandes des ARNm de l'ADAMTS-4 sont quantifiées en unité arbitraire et normalisées avec le GAPDH; le graphique présente les moyennes avec la SE, les valeurs moyennes sont issues de trois expériences, la valeur P est considérée significative ($P < 0.05$), $N = 3$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (C) L'activité enzymatique de l'ADAMTS-4 mesurée par ELISA est montrée par le graphique, le graphique montre les moyennes de deux expériences.

2. La Rapamycine inhibe partiellement la phosphorylation de la p44/42 MAPK stimulée par le TNF- α .

Pour étudier les effets de la Rapamycine sur les voies des MAPKs stimulées par les cytokines IL-1 β et TNF- α , les chondrocytes humains (NHAC) sont traités avec la Rapamycine (20 μ M) sans ou en présence de l'IL-1 β et du TNF- α . La mesure des protéines phosphorylées a été accomplie par le Western blot. Les résultats montrent qu'en présence de l'IL-1 β le taux du phospho-p44/42-MAPK a été augmenté d'où l'IL-1 β stimule la phosphorylation du p44/42-MAPK; cependant, la Rapamycine n'a pas montré d'effet sur l'inhibition de cette phosphorylation. D'autre part, le TNF- α stimule aussi la phosphorylation du p44/42 MAPK; cette phosphorylation a été réduite en présence de la Rapamycine. La voie du p44/42-MAPK stimulée par le TNF- α est alors partiellement bloquée par la Rapamycine (Fig.10-A). La Rapamycine diminue l'expression du p44/42-MAPK induite par le TNF- α jusqu'à 48.1% (Fig.10-B).

(A)



(B)

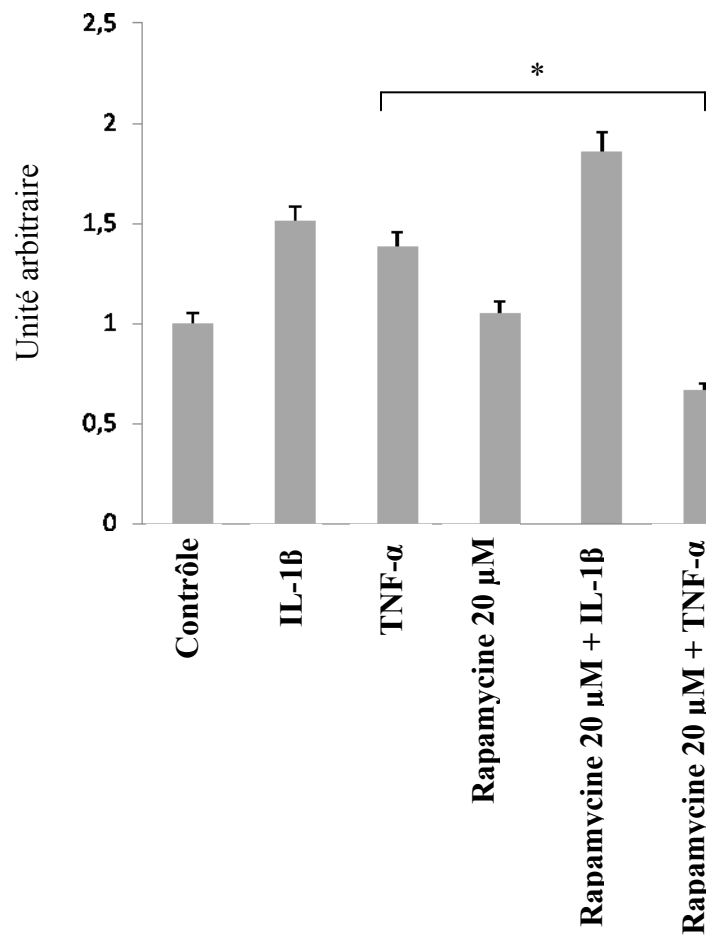


Figure 10: La Rapamycine bloque partiellement l'expression du phospho-p44/42 MAPK stimulé par le TNF- α (A) Les chondrocytes NHAC sont exposés pour 30 minutes avec la Rapamycine, puis stimulées avec IL-1 β et TNF- α pendant 24 h. le taux des protéines phospho-p44/42 mesuré par Western blot est présenté. (B) La présentation graphique montre la différence semi-quantitatif de deux expériences (+ ou – SE); la valeur P est considérée significative ($P < 0.05$), $n=2$. * $P < 0.05$.

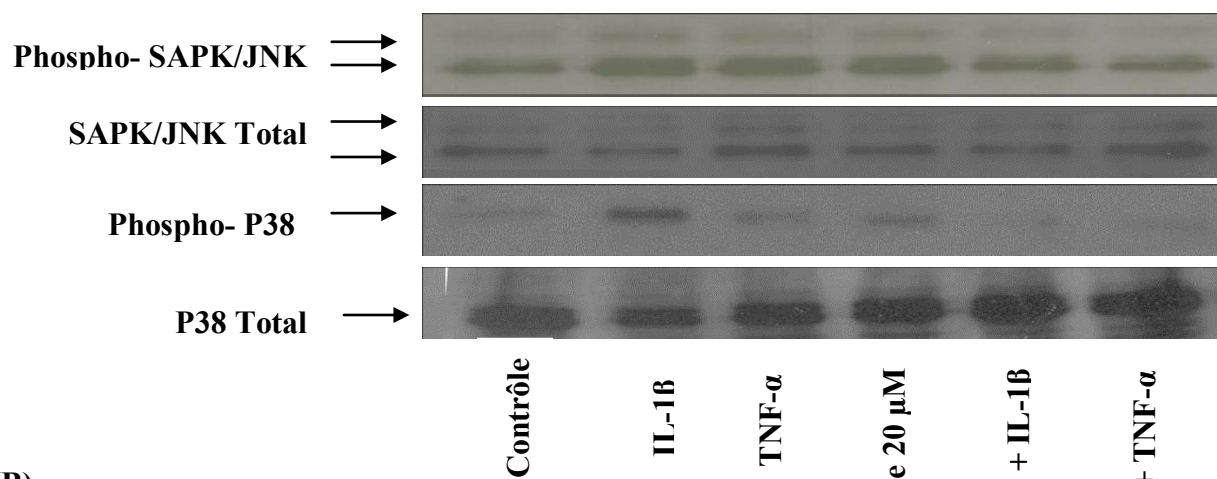
3. La Rapamycine inhibe la phosphorylation des protéines p38 et JNK stimulées par IL-1 β .

La p38 MAPK et le SAPK/JNK constituent deux importantes voies stimulées par les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF- α . La mesure de l'activation de ces voies est faite par le Western blot. Les cellules NHAC sont stimulées avec l'IL-1 β et le TNF- α et cela en présence de la Rapamycine ou en son absence. Selon la figure 11, l'IL-1 β active fortement la phosphorylation de la p38 MAPK dans les cellules NHAC; la Rapamycine montre un effet très fort sur cette voie, ainsi le taux du phospho-p38 MAPK stimulé par l'IL-1 β a été fortement diminué en présence de la Rapamycine (20 μ M). Cependant, le TNF- α n'a pas présenté d'effet sur l'induction du phospho-p38 MAPK, puisque le niveau des protéines p38 MAPK phosphorylées n'a pas augmenté en présence du TNF- α par rapport à celui du contrôle.

De même, la mesure des phospho-JNK par le Western blot dans les cellules NHAC a montré que l'IL-1 β active aussi la phosphorylation de la protéine JNK; la Rapamycine a diminuée cette phosphorylation comme c'est observé. Pourtant, le TNF- α n'arrive pas aussi à induire la phosphorylation des protéines JNK, puisque le taux du phospho-JNK n'a pas augmenté en présence du TNF- α par rapport au contrôle; alors la Rapamycine ne présente pas d'effets dans cette voie en présence du TNF- α .

Les totaux de ces protéines ne sont pas affectés par la Rapamycine. La Rapamycine diminue la phosphorylation de la p38-MAPK induite par l'IL-1 β de 86.5%, alors qu'elle a diminué la phosphorylation de la SAPK/JNK induite par l'IL-1 β de 25.5% (Fig.11-B).

(A)



(B)

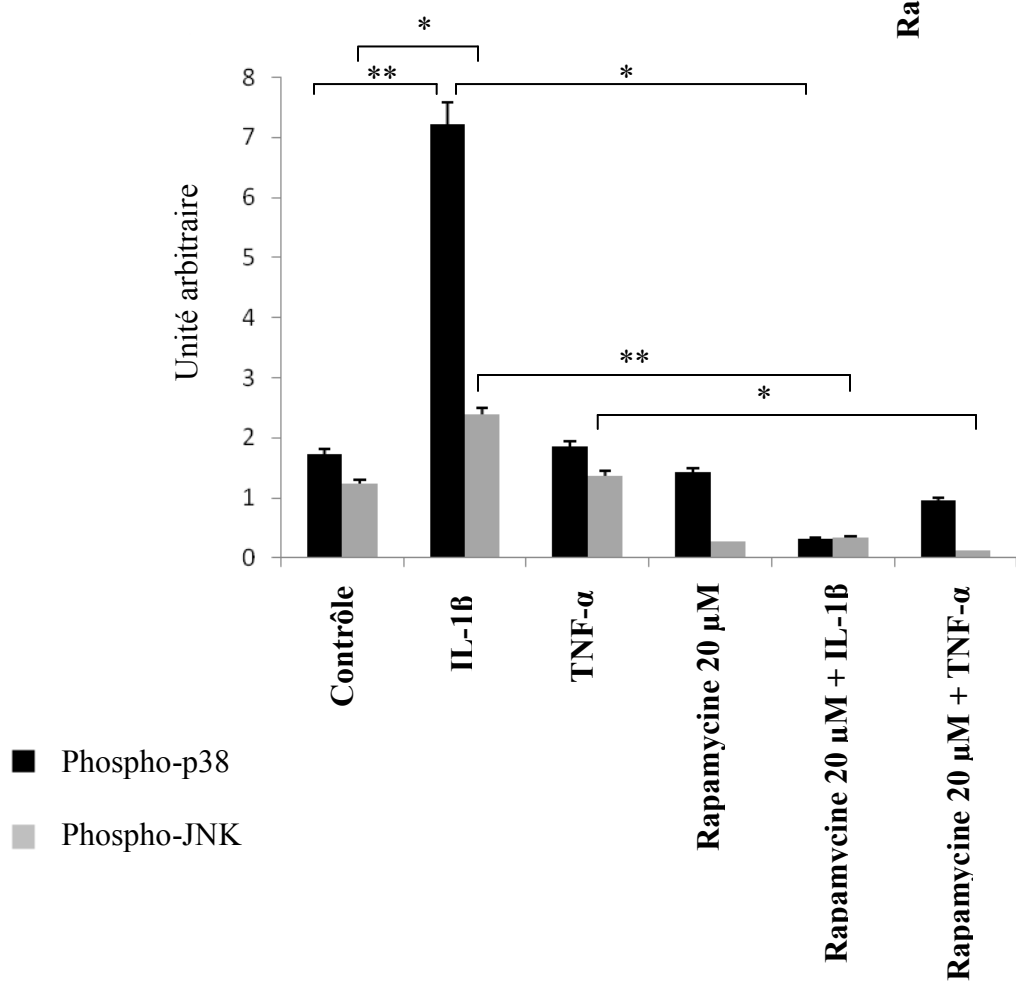


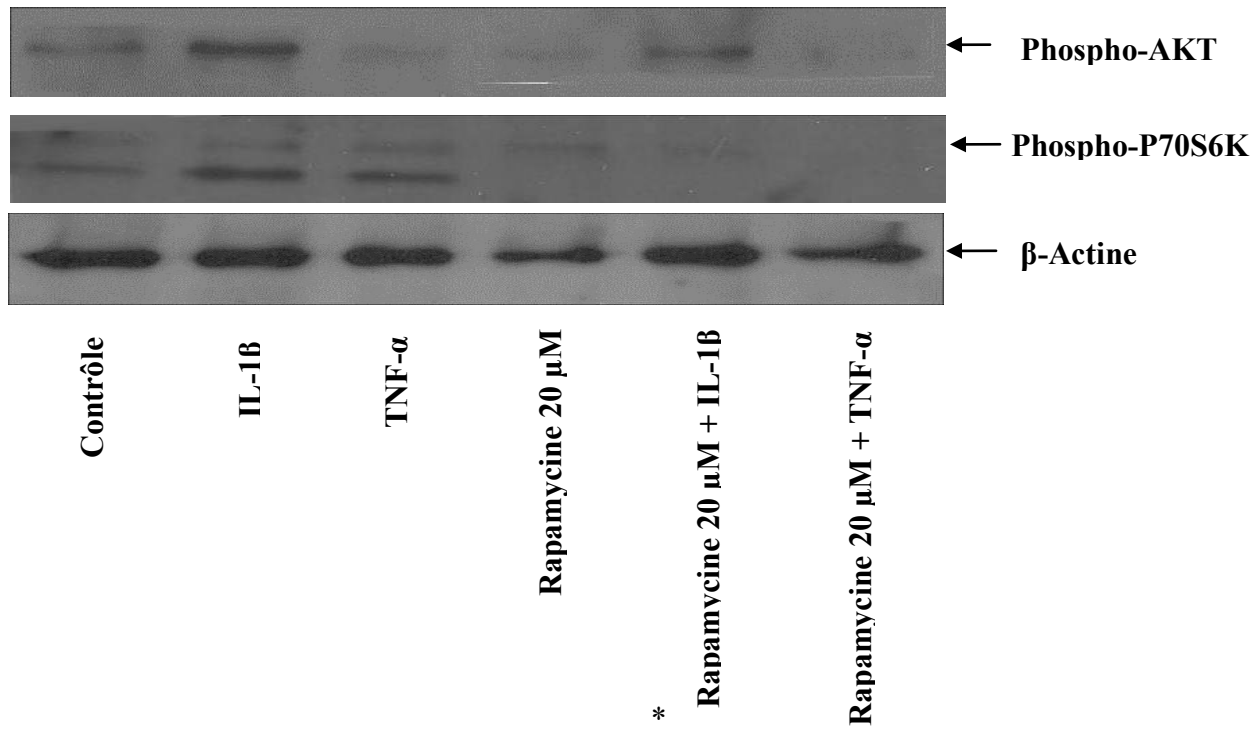
Figure 11: La Rapamycine inhibe l'expression de la JNK MAPK et de la p38 MAPK par la Rapamycine (20 μ M). (A) Des chondrocytes humaines sont traités par la Rapamycine pour 30 min puis stimulées avec l'IL-1 β et le TNF- α pendant 24 h. Les protéines sont mesurées par Western blot. (B) Une représentation graphique présente les moyennes de trois expériences pour la p38 et de deux expériences pour le JNK MAPK avec + ou – SE, la valeur P est considérée significative ($P < 0.05$). * $P < 0.05$ et ** $P < 0.01$.

4. La Rapamycine bloque la voie de l'AKT stimulée par l'IL-1 β et la phosphorylation de la p70 S6K stimulée par l'IL-1 β et le TNF- α

L'AKT joue un rôle important dans la destruction du cartilage articulaire. Cette voie peut être une cible pour la Rapamycine durant l'OA, pour diminuer ainsi la progression de cette maladie. Pour étudier les effets de la Rapamycine sur l'activation du phospho-AKT, des chondrocytes humains NHAC stimulés par l'IL-1 β et le TNF- α sont utilisés en présence ou en absence de la Rapamycine (20 μ M); la mesure des phosphoprotéines est accomplie par le Western blot. Le taux du phospho-AKT a été augmenté en présence de l'IL-1 β par rapport au contrôle. La figure 12-A montre que la Rapamycine (20 μ M) bloque l'activation de l'AKT par l'IL-1 β ; ainsi, le taux de la protéine AKT phosphorylée par IL-1 β est diminué en présence de la Rapamycine de 25% (Fig.12-B). Au contraire, le TNF- α n'a pas stimulé la phosphorylation de l'AKT; ainsi son niveau a été diminué par rapport au contrôle. La Rapamycine n'a pas présenté une inhibition de l'activation du phospho-AKT en présence du TNF- α .

Il est déjà démontré que la protéine p70 S6 K est une cible qui peut être bloquée par la Rapamycine. Pour démontrer l'effet de cet immunosuppresseur sur la voie de p70 S6 K dans les chondrocytes articulaires, des cellules NHAC sont stimulées ainsi par IL-1 β et TNF- α en présence ou en absence de la Rapamycine. On a vu par le Western blot que le niveau des phospho-p70 S6K a été augmenté en présence de l'IL-1 β ou du TNF- α par rapport aux contrôles; en présence de la Rapamycine, le taux de ces phospho-p70 S6K a été diminué (Fig.12); la Rapamycine bloque alors les protéines p70 S6 K phosphorylées par les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et TNF- α). Ainsi l'expression du phospho-p70 S6K activée par l'IL-1 β est diminuée par la Rapamycine de 71.3%, et celle du phospho-p70 S6K activée par le TNF- α est diminuée par la Rapamycine de 62.3% (Fig.12-B).

(A)



(B)

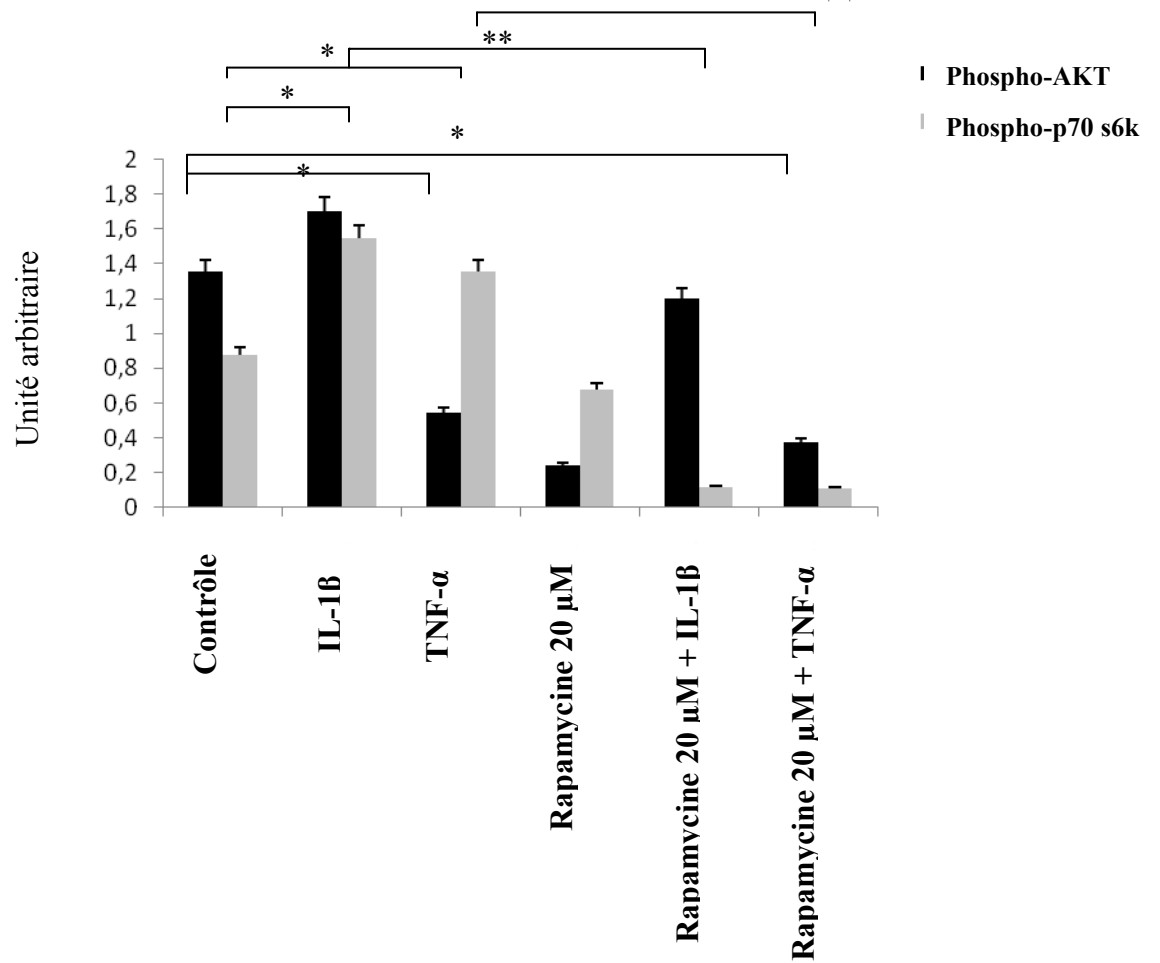
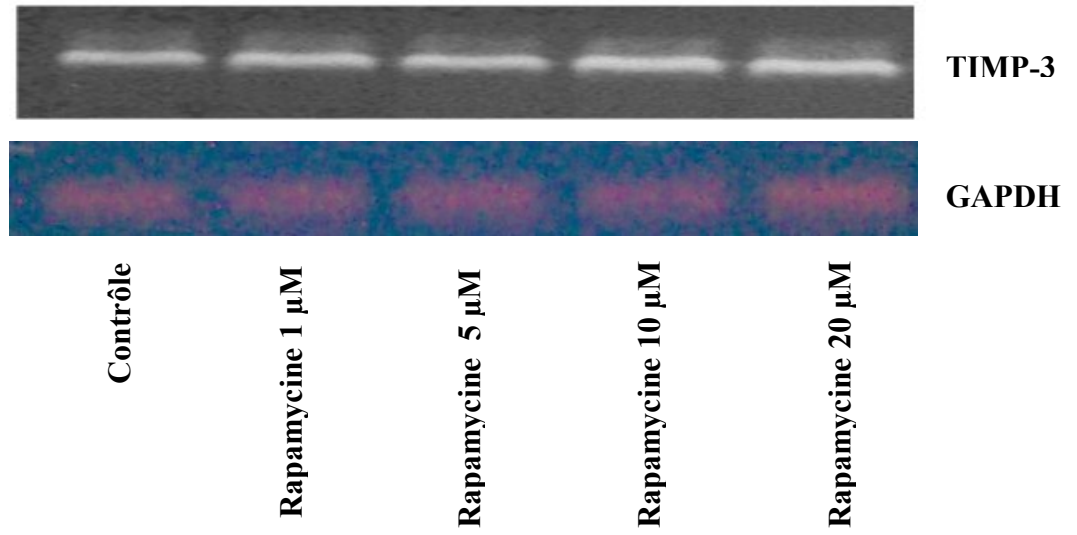


Figure 12: La Rapamycine bloque l'expression de l'AKT stimulée par l'IL-1 β et de la p70 S6K stimulée par les deux cytokines IL-1 β et TNF- α . (A) Des chondrocytes humaines normales traitées avec la Rapamycine (20 μ M) puis stimulées ou non avec IL-1 β et TNF- α . Les phospho-AKT et p70 S6 Kinases sont mesurées par le Western blot. (B) les moyennes (+ ou – SE) de trois expériences pour l'AKT et de deux expériences pour la p70 S6K sont montrées par le graphique. *P<0.05 et **P<0.01.

5. La Rapamycine augmente légèrement l'expression du TIMP-3.

Il est déjà connu que les TIMPs sont des inhibiteurs des métalloprotéinases qui seront diminuées lors de la pathologie d'OA. De plus, TIMP-3 est un inhibiteur d'ADAMTS-4. Pour voir si la Rapamycine a des effets positifs sur l'expression des TIMP-3, des chondrocytes NHAC sont traitées avec différentes concentrations de Rapamycine (1, 5, 10, 20 μ M). L'expression du TIMP-3 est légèrement augmentée en présence de la Rapamycine. Ainsi à des concentrations de 10 μ M et 20 μ M de Rapamycine, l'expression de l'ARNm du TIMP-3 a été plus élevée (Fig.13-A). Le graphique montre cette légère augmentation du TIMP-3 en présence de la Rapamycine (Fig.13-B). Ainsi en comparant le taux de l'ARNm du TIMP-3 en présence de la Rapamycine, on observe que ce taux est augmenté par rapport à celui du contrôle à de différentes concentrations. Cependant, cette augmentation a été à peu près la même à des concentrations de 1 μ M et de 5 μ M de Rapamycine; de même, le taux de l'ARNm du TIMP-3 a augmenté à peu près de la même façon en présence des concentrations de 10 μ M et de 20 μ M de Rapamycine (Fig.13-B).

(A)



(B)

■ TIMP-3

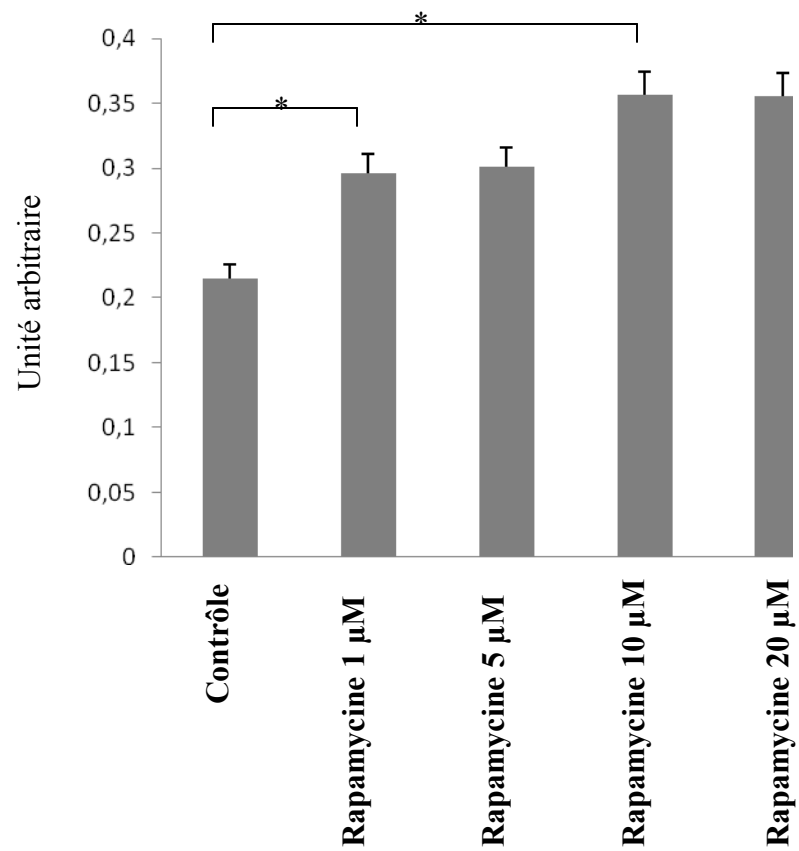


Figure 13: (A) Analyse RT-PCR montrant l'expression de l'ARNm du TIMP-3 avec le GAPDH en présence de différentes doses de la Rapamycine. Le gel d'agarose montre que la Rapamycine augmente partiellement l'expression de l'ARNm du TIMP-3 dans les chondrocytes humaines NHAC. (B) Représentation graphique présentant les moyennes de deux expériences avec (+ ou – SE), la valeur P est considérée significative ($P < 0.05$); $n=2$.

Chapitre IV:

Discussion

Discussion

L'OA est une maladie dégénérative du cartilage articulaire qui présente selon Santé Canada la troisième maladie chronique courante au Canada après l'allergie et les maladies cardiovasculaires; cela est dû selon eux au vieillissement de la population. Plusieurs facteurs mènent à la progression de la pathologie de l'OA. Dans ce temps, les recherches dans ce domaine sont très actives. Ceci est pour étudier les différents mécanismes de la pathogenèse de l'OA et pour trouver alors des thérapies qui mènent à l'arrêt de la progression de cette maladie. Nos résultats suggèrent que la Rapamycine pourrait servir une telle thérapie.

Durant la pathologie de l'OA, les composantes de l'ECM subissent une dégradation par des enzymes protéolytiques (MMPs, ADAMTS). Le cartilage articulaire aura alors une perte de l'équilibre entre le catabolisme (dégradation des composantes de l'ECM) qui sera plus élevé que l'anabolisme (synthèse des composantes de l'ECM). Des importants facteurs conduisant au catabolisme du cartilage sont les cytokines pro-inflammatoires $\text{TNF-}\alpha$ et $\text{IL-1}\beta$. Ces cytokines stimulent la dégradation de l'agrécan qui forme la majeure partie de l'ECM du cartilage articulaire, par l'ADAMTS-4. Ces enzymes protéolytiques constituent alors un important facteur dans la dégénérescence du cartilage articulaire chez les patients OA (14).

La stimulation de l'expression de l'ADAMTS-4 induit par l' $\text{IL-}\beta$ et le $\text{TNF-}\alpha$ est déclenchée par une série de cascade de signalisation cellulaire au niveau des chondrocytes articulaires. Cette série comporte plusieurs voies de signalisation telles que les voies des MAPKs (131). Cependant, les thérapies étudiées visent à bloquer l'activation des voies de signalisation qui entrent dans la progression de l'OA. Les immunosuppresseurs ont des effets bénéfiques dans l'arthrose; il est déjà démontré que la cyclosporine A présente une protection contre la dégradation du cartilage *in vitro* et cela par l'inhibition de l'expression du gène d'ADAMTS (230).

La Rapamycine est un ancien immunosuppresseur utilisé pour empêcher le rejet de la greffe lors de la transplantation des organes. La Rapamycine est connue comme un inhibiteur de la mTOR qui est un médiateur du dommage structural des tissus des patients avec la RA. Une nouvelle étude a montré que la Rapamycine réduit l'OA expérimentale chez des souris par un mécanisme d'activation d'autophagie (231). Notre étude a examiné les effets de la Rapamycine sur l'induction de l'ADAMTS-4 par les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et TNF- α). Ces deux cytokines jouent un rôle puissant dans le déclenchement du catabolisme du cartilage et dans la progression des maladies arthritiques par augmentation de l'inflammation et de la résorption osseuse, et par la destruction du cartilage articulaire (88) (89). En premier lieu, nous avons montré que la Rapamycine dès une concentration de 10 μ M inhibe l'expression de l'ARNm de l'ADAMTS-4 stimulée par IL-1 β et TNF- α dans les chondrocytes articulaires (NHAC). Cette inhibition a été augmentée lorsque la concentration de la Rapamycine est plus élevée. Ceci est montré par la réduction du taux de l'ARNm de l'ADAMTS-4. Nous avons observé que la Rapamycine présente un effet plus grand dans l'inhibition de l'ADAMTS-4 stimulé par le TNF- α . Dans le cartilage OA, les enzymes cataboliques ADAMTS-4 coupent l'agrécan au niveau Glu373 – Ala374, d'où il y aura une augmentation des fragments ARGSVIL issues du clivage des agrécans par les ADAMTS-4 (9, 11, 39). Nous avons vu que le taux de l'ARGSVIL a été légèrement diminué lors du traitement avec la Rapamycine dans les chondrocytes normaux stimulés avec l'IL-1 β ; alors qu'on n'a pas vu d'effet pour la Rapamycine lorsque les chondrocytes sont stimulés avec le TNF- α . Le rôle de la Rapamycine dans l'inhibition de l'activité enzymatique de l'ADAMTS-4 n'est pas encore clair puisque l'IL-1 β et le TNF- α n'ont pas induit d'une façon prévue l'activité de l'ADAMTS-4 dans les chondrocytes. Ainsi le taux de l'ARGSVIL n'a pas augmenté en présence du TNF- α , et il est légèrement augmenté en présence de l'IL-1 β .

Pour démontrer le mécanisme d'action de la Rapamycine, nous avons étudié les différentes voies de signalisation qui peuvent être son cible. La voie des MAPKs présente une importante voie très connue dans les maladies arthritiques. Il est déjà connu que ces protéines kinases sont activées dans la membrane synoviale et les fibroblastes synoviaux

lors de la RA; en plus, les cytokines pro-inflammatoires constituent des importants facteurs responsables de leur activation (113). Les cytokines (IL-1 β et TNF- α) activent la voie catabolique menant à la dégradation du cartilage articulaire via les voies des MAPKs (p44/42 MAPK, SAPK/JNK, p38 MAPK) (131). Nous avons démontré que le niveau de phosphorylation de la p44/42 MAPK est augmenté par la stimulation à l'IL-1 β et le TNF- α ; la Rapamycine a inhibé partiellement cette phosphorylation lorsqu'elle est induite seulement par le TNF- α . Néanmoins, la Rapamycine n'a pas inhibé la phosphorylation de la p44/42 MAPK lorsqu'elle est stimulée par l'IL-1 β . La Rapamycine peut inhiber alors un médiateur spécifique inclus dans la voie de la p44/42 MAPK stimulée par le TNF- α et non par l'IL-1 β . L'inhibition sélective par la Rapamycine de la phosphorylation de la p44/42 MAPK stimulée par le TNF- α et non l'IL-1 β indique qu'il y a une différence entre ces deux cytokines dans le mécanisme de transduction du signal. Ceci peut être dû à la différence entre les récepteurs de chaque cytokine. Nous avons démontré aussi que l'IL-1 β induit la phosphorylation des deux protéines p38 MAPK et JNK dans les chondrocytes humains (NHAC); cette activation par l'IL-1 β a été réduite par la Rapamycine. Ainsi, l'activation de la phosphorylation de ces protéines kinases par l'IL-1 β peut amener à l'activation de plusieurs facteurs de transcription qui rentrent dans la régulation du gène ADAMTS-4. Ceci peut traduire que la Rapamycine produit son effet au niveau de ces protéines kinases lorsqu'elles sont stimulées seulement par l'IL-1 β ; ce qui amène à l'inhibition de l'expression de l'ADAMTS-4. Cependant, le niveau du phospho-p38 MAPK et du phospho-JNK n'a pas augmenté par comparaison entre les chondrocytes normaux et les chondrocytes stimulés par le TNF- α .

Il est déjà démontré que différents facteurs de transcription sont activés par les MAPKs dans les chondrocytes et que ces facteurs sont responsables de l'expression des gènes des protéases (ADAMTS et MMP) comme l'AP-1 et le NF- κ B (119, 232, 233). Notre étude n'a pas montré quels facteurs seront bloqués lors du traitement avec la Rapamycine, ceci reste à démontrer.

D'une autre part, d'autres mécanismes conduisant à l'inhibition d'autres voies de signalisation auront lieu au niveau des chondrocytes. En plus des MAPKs, le PI3K/AKT

présente une importante voie de signalisation impliquée généralement dans la régulation de l'immunité et de l'inflammation. Nous avons déjà démontré que les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF- α induit l'expression des protéases par l'activation de plusieurs voies de signalisation. La voie PI3K/AKT joue un rôle important dans la destruction du cartilage articulaire. L'induction de la phosphorylation de l'AKT par l'IL-1 suggère une similarité avec l'induction de la phosphorylation du mTOR par l'IL-17 associée avec la prolifération des fibroblastes synoviaux; ces derniers sont connus par la production des protéases et l'envahissement du cartilage durant la RA (234). Notre équipe a montré que la voie PI3K/AKT est impliquée dans la régulation d'ADAMTS-4 (62). Il a été rapporté aussi que la Rapamycine avec une grande concentration peut inhiber la phosphorylation de l'AKT dans les cellules cancéreuses (235), ce qui corrèle avec notre étude. Dans cette étude, nous avons démontré que la Rapamycine (20 μ M) peut agir au niveau des chondrocytes humaines par le blocage de la voie de PI3K/AKT lorsqu'elle est induite par l'IL-1 β . Nos données montrent que l'induction de la phosphorylation de l'AKT par l'IL-1 β est partiellement inhibée par la Rapamycine; d'où la suggestion que cet agent peut diminuer l'activité de l'AKT au niveau des chondrocytes OA. Ceci pourra avoir comme conséquence la réduction de l'expression de différents facteurs de transcription ce qui conduit alors au blocage de l'expression de l'ADAMTS-4 lors de la stimulation par l'IL-1 β . Mais nous avons remarqué que le TNF- α n'a pas stimulé la phosphorylation de l'AKT dans les chondrocytes humains, pour cela la Rapamycine ne présente pas un effet à ce niveau. Le mécanisme d'induction de la phosphorylation de l'AKT par les cytokines n'est pas beaucoup clair encore, puisque l'activation de l'AKT est simulée avec l'IL-1 β seulement alors qu'il y avait un effet contraire en présence du TNF- α .

La voie de PI3K/AKT entraîne l'activation de plusieurs cascades par l'activation de la phosphorylation de plusieurs protéines, ce qui mène à des différentes réponses cellulaires. Une des importantes protéines qui peut être activée par le PI3K/AKT est la protéine ribosomale p70 S6K. Cette protéine régule la croissance cellulaire ainsi que le métabolisme cellulaire (synthèse des protéines). Pour cela, on a mesuré le taux des protéines p70 S6K phosphorylées dans les chondrocytes stimulés avec les cytokines en présence ou en absence

de la Rapamycine. Nous avons démontré que le taux des protéines p70 s6 kinases phosphorylées a été diminué lors du traitement avec la Rapamycine; ceci était dans le cas où les chondrocytes sont stimulés par l'IL-1 β et le TNF- α . Ces résultats nous montrent que la phosphorylation de la p70 S6k activée par PI3K/AKT via la protéine mTOR est bloquée en présence de la Rapamycine dans les chondrocytes articulaires humains, ce qui entraîne l'inhibition de l'activation d'autres protéines induites par la p70 S6K telle que l'eIF-4B (eukaryotic initiation factor-4B). Cette inhibition bloque alors l'expression des gènes. Ce résultat coïncide avec d'autres recherches qui utilisent des inhibiteurs des différentes cibles de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR qui contrôle l'activité de la protéine p70 S6K. Il est déjà connu que la protéine p70 S6K induit à son tour la phosphorylation de plusieurs substrats ce qui conduit alors à plusieurs conséquences biologiques (236). Au niveau des chondrocytes, l'une de ces conséquences peut être traduite par l'activation de la synthèse des enzymes cataboliques telles que les ADAMTS, cette activation va augmenter par l'induction des cytokines IL-1 β et TNF- α lors de l'OA. Puisque les deux facteurs de transcription eIF4B et eEF2K (eukaryotic elongation factor 2 kinase), activés par la p70 S6K induisent la synthèse et l'élongation des protéines (237, 238), il se peut que leur activation va être inhibée par l'action de la Rapamycine au niveau des chondrocytes OA, d'où la diminution de la synthèse des ADAMTS. Cette hypothèse pourrait être vérifiée dans notre laboratoire très prochainement. Les composantes de la voie de signalisation du mTOR incluant l'AKT et la p70 S6K sont activées dans les membranes synoviales des patients avec la RA et dans des modèles animaux avec RA (240). La réduction de la phosphorylation de la p70 S6K dans nos résultats suggère l'implication de cette voie dans l'induction de l'ADAMTS-4 par les cytokines. Récemment, l'inhibition du mTOR par la Rapamycine dans un modèle expérimental d'une souris RA exprimant le TNF- α montre une protection contre les synovites, la résorption osseuse, et la perte des PGs (agrécanes) (240) (Fig.14).

Finalement, nous avons testé l'action de la Rapamycine sur le TIMP-3. Au niveau du cartilage articulaire, on trouve plusieurs inhibiteurs endogènes du catabolisme qui peuvent aider à maintenir l'équilibre entre la synthèse protéique et la dégradation des différentes

composantes. Les TIMPs présentent des importants inhibiteurs des MMPs et des ADAMTS. Ainsi, il a été rapporté que le TIMP-3 inhibe fortement l'activité de l'ADAMTS-4 et de l'ADAMTS-5 (45, 46). Lors de l'OA, l'activité des ADAMTS-4 est augmentée. Pour compenser la dégradation des PGs par les ADAMTS-4, on a suggéré que la Rapamycine augmente l'activité du TIMP-3 dans les chondrocytes humains. Nos résultats montrent une légère augmentation du taux de l'ARNm du TIMP-3 en présence de la Rapamycine dans les chondrocytes humains. La Rapamycine peut alors jouer un double rôle au niveau du traitement du cartilage articulaire OA. Ceci est traduit par l'inhibition des voies de signalisation conduisant à l'augmentation de la synthèse des ADAMTS-4, et par l'augmentation de l'expression des TIMP-3 qui inhibent ainsi l'activité de ces ADAMTS-4. Ainsi, le mécanisme par lequel le TIMP-3 est augmenté par la Rapamycine n'était pas étudié. Finalement, la figure 14 présente d'une façon générale un schéma qui montre les différentes cibles de la Rapamycine au niveau des voies de signalisation présentées. Ainsi, la Rapamycine peut bloquer la phosphorylation des protéines p38 MAPK, JNK, et AKT stimulé par l'IL-1 β ; elle peut exercer un effet inhibiteur au niveau de la p44/42 MAPK lorsque la phosphorylation cette dernière est induite par le TNF- α . De plus, la protéine p70 S6K est une autre cible qui est inhibée par la Rapamycine. Les facteurs de transcription présentés dans le schéma sont activés d'une façon générale par ces voies. L'inhibition de ces voies peut entraîner le blocage de l'expression de plusieurs facteurs de transcription qui stimulent l'expression de l'ADAMTS-4; le niveau de ce dernier va diminuer, en prévenant ainsi la destruction du cartilage.

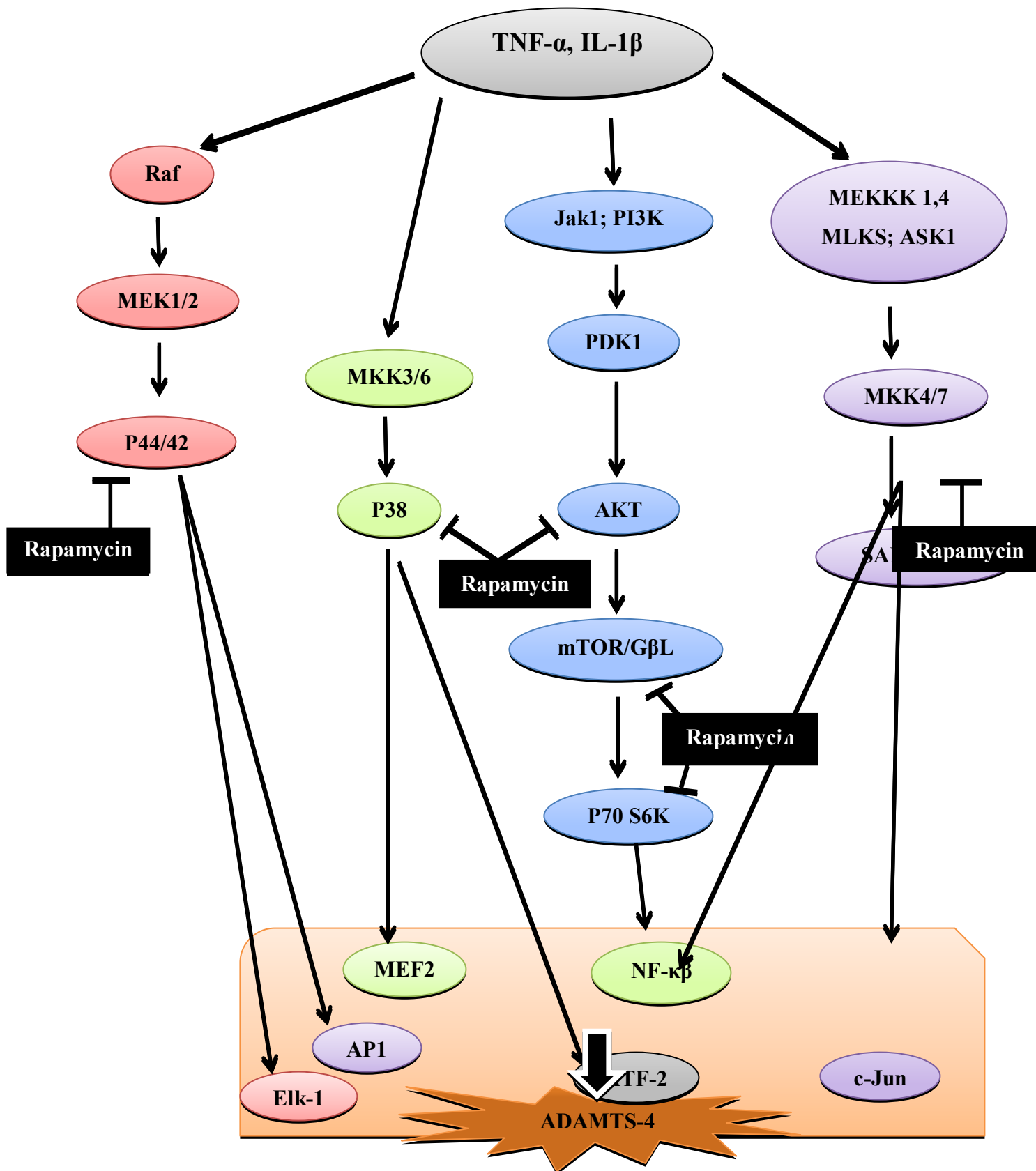


Figure 14: Représentation schématique des différentes voies de signalisation stimulées par les cytokines et bloquées par la Rapamycine.

Chapitre V:

Conclusion

Conclusion

L'augmentation de l'expression de l'ADAMTS-4 présente l'une des principales causes de la dégradation du cartilage articulaire et de la progression de l'OA. Plusieurs études visent à trouver des produits qui peuvent inhiber l'expression de ces protéases. Ainsi, il a été rapporté que les immunosuppresseurs peuvent avoir des effets bénéfiques dans le traitement de l'OA. Nous avons démontré que la Rapamycine inhibe l'expression de l'ADAMTS-4 dans les chondrocytes humains ainsi que son activité enzymatique. La Rapamycine peut être considérée dans le rétablissement de l'homéostasie du cartilage articulaire. En plus, l'étude de plusieurs voies de signalisation a indiqué leur implication dans l'augmentation de l'expression de l'ADAMTS-4 lors de l'OA. Ces voies pourront devenir des cibles dans le développement des interventions thérapeutiques. Notre étude montre que certaines voies induites par l'IL-1 β telles que les voies du p38 MAPK, du SAPK/JNK, et de l'AKT-p70 S6K, peuvent être bloquées par l'action de la Rapamycine. Alors que la voie de la p44/42 MAPK a été bloquée partiellement par la Rapamycine. Nous avons démontré aussi que la Rapamycine bloque la protéine p70 S6K stimulée par l'IL-1 β et le TNF- α . La Rapamycine présente en plus un facteur activant le TIMP-3. Ce dernier appartenant à la famille des inhibiteurs endogènes de l'ADAMTS-4 va aider alors à la compensation de la dégradation du cartilage. Pour comprendre le mécanisme complet par le quelle la Rapamycine accomplit son action, différents facteurs de transcription (NF- κ B, AP-1, ect...) impliqués dans les voies bloquées par la Rapamycine peuvent être étudiées. Ceci va conduire à avoir plus d'idées à propos des mécanismes d'inhibition, et à développer plusieurs stratégies pour le traitement de cette maladie. Récemment, il a été démontré que la Rapamycine active le mécanisme préventif d'autophagie, ce qui va ouvrir d'autre avenue de recherche.

Chapitre VI:

Bibliographie

Bibliographie

1. Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ. Articular cartilage and osteoarthritis. Instr Course Lect. 2005; 54:465-80.
2. Zhang Y, Jordan JM. Epidemiology of osteoarthritis. Clin Geriatr Med. 2010 Aug;26(3):355-69.
3. Corti MC, Rigon C. Epidemiology of osteoarthritis: prevalence, risk factors and functional impact. Aging Clin Exp Res. 2003 Oct; 15(5):359-63.
4. Aigner T, Stove J (2003) Collagens—major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. Adv Drug Deliv Rev 55:1569–1593.
5. Muir H. The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. Bioessays. 1995 Dec;17(12):1039-48.
6. B Goldring MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. Arthritis Rheum. 2000 Sep;43(9):1916-26.
7. Heinegård D, Saxne T. The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. Nat Rev Rheumatol. 2011 Jan;7(1):50-6.

8. Dudhia J. Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage. *Cell Mol Life Sci.* 2005 Oct; 62(19-20):2241-56.
9. Huang K, Wu LD. Aggrecanase and aggrecan degradation in osteoarthritis: a review. *J Int Med Res.* 2008 Nov-Dec;36(6):1149-60.
10. Sellam J, Berenbaum F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2010 Nov;6(11):625-35.
11. MW, Bayne EK, Lohmander LS. Aggrecan degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Acta Orthop Scand Suppl.* 1995 Oct;266:92-7.
12. Bertrand J, Cromme C, Umlauf D, Frank S, Pap T. Molecular mechanisms of cartilage remodelling in osteoarthritis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010 Oct; 42(10):1594-601.
13. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum.* 2001 Jun;44(6):1237-47.
14. Loeser RF. Molecular mechanisms of cartilage destruction in osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2008 Oct-Dec;8(4):303-6.
15. Roach HI and Tilley S, The pathogenesis of osteoarthritis, *Bone and Osteoarthritis Topics in Bone Biology*, 2008, Volume 4, 1-18, DOI: 10.1007/978-1-84628-701-5_1.

16. L'Hermette MF, Tourny-Chollet C, Polle G, Dujardin FH. Articular cartilage, degenerative process, and repair: current progress. *Int J Sports Med*. 2006 Sep;27(9):738-44.
17. Jimenez SA, Williams CJ: **Genetic and metabolic aspects**. In *In Osteoarthritis: Clinical and Experimental Aspects*. Edited by Reginster J-Y, Pelletier J-P, Martel-Pelletier J, Henrotin Y. Berlin, New York: Springer; 1999:134-156.
18. Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Naimark A, Weissman B, Aliabadi P, Levy D. Risk factors for incident radiographic knee osteoarthritis in the elderly: the Framingham Study. *Arthritis Rheum*. 1997 Apr;40(4):728-33.
19. Martel-Pelletier J, Pelletier JP. Is osteoarthritis a disease involving only cartilage or other articular tissues? *Eklek Hastalik Cerrahisi*. 2010 Apr;21(1):2-14
20. Rédini F. Structure and regulation of articular cartilage proteoglycan expression. *Pathol Biol (Paris)*. 2001 May;49(4):364-75.
21. Van der Kraan PM, Blaney Davidson EN, van den Berg WB. A role for age-related changes in TGFbeta signaling in aberrant chondrocyte differentiation and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(1):201.
22. Dreier R. Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders. *Arthritis Res Ther*. 2010; 12(5):216.
23. Ashraf S, Walsh DA. Angiogenesis in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2008 Sep; 20(5):573-80.

24. Goldring MB, Goldring SR. Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Mar;1192:230-7.
25. Loeser RF. Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009 Aug;17(8):971-9.
26. Aigner T, Kim HA, Roach HI. Apoptosis in osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2004 Aug; 30(3):639-53.
27. Goldring MB, Marcu KB. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(3):224.
28. Tang BL. ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001 Jan;33(1):33-44.
29. Jones GC, Riley GP. ADAMTS proteinases: a multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(4):160-9.
30. Lin EA, Liu CJ. The role of ADAMTSs in arthritis. *Protein Cell.* 2010 Jan;1(1):33-47.
31. Nagase H, Kashiwagi M. Aggrecanases and cartilage matrix degradation. *Arthritis Res Ther.* 2003;5(2):94-103.
32. Sandy JD, Flannery CR, Neame PJ, Lohmander LS. The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence for the involvement in osteoarthritis

of a novel proteinase which cleaves the Glu 373-Ala 374 bond of the interglobular domain. *J Clin Invest.* 1992 May;89(5):1512-6.

33. Song RH, Tortorella MD, Malfait AM, Alston JT, Yang Z, Arner EC, Griggs DW. Aggrecan degradation in human articular cartilage explants is mediated by both ADAMTS-4 and ADAMTS-5. *Arthritis Rheum.* 2007 Feb;56(2):575-85.
34. Arner EC. Aggrecanase-mediated cartilage degradation. *Curr Opin Pharmacol.* 2002 Jun;2(3):322-9.
35. Verma P, Dalal K. ADAMTS-4 and ADAMTS-5: Key enzymes in osteoarthritis. *J Cell Biochem.* 2011 Aug 3. doi: 10.1002/jcb.23298.
36. Gao G, Westling J, Thompson VP, Howell TD, Gottschall PE, Sandy JD. Activation of the proteolytic activity of ADAMTS4 (aggrecanase-1) by C-terminal truncation. *J Biol Chem.* 2002 Mar 29;277(13):11034.
37. Lohmander LS, Neame PJ, Sandy JD. The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence that aggrecanase mediates cartilage degradation in inflammatory joint disease, joint injury, and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1993 Sep;36(9):1214-22.
38. Bondeson J, Wainwright S, Hughes C, Caterson B. The regulation of the ADAMTS4 and ADAMTS5 aggrecanases in osteoarthritis: a review. *Clin Exp Rheumatol.* 2008 Jan-Feb;26(1):139-45.

39. Tortorella MD, Pratta M, Liu RQ, Austin J, Ross OH, Abbaszade I, Burn T, Arner E. Sites of aggrecan cleavage by recombinant human aggrecanase-1 (ADAMTS-4). *J Biol Chem*. 2000 Jun 16;275(24):18566-73.
40. Kashiwagi M, Enghild JJ, Gendron C, Hughes C, Caterson B, Itoh Y, Nagase H. Altered proteolytic activities of ADAMTS-4 expressed by C-terminal processing. *J Biol Chem*. 2004 Mar 12;279(11):10109-19.
41. Porter S, Clark IM, Kevorkian L, Edwards DR. The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J*. 2005 Feb 15; 386(Pt 1):15-27.
42. Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito BA, Blanchet T, Ma HL, Flannery CR, Kanki K, Wang E, Peluso D, Yang Z, Majumdar MK, Morris EA. Characterization of and osteoarthritis susceptibility in ADAMTS-4-knockout mice. *Arthritis Rheum*. 2004 Aug;50(8):2547-58.
43. Koshy PJ, Lundy CJ, Rowan AD, Porter S, Edwards DR, Hogan A, Clark IM, Cawston TE. The modulation of matrix metalloproteinase and ADAM gene expression in human chondrocytes by interleukin-1 and oncostatin M: a time-course study using real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum*. 2002 Apr;46(4):961-7.
44. Hashimoto G, Aoki T, Nakamura H, Tanzawa K, Okada Y. Inhibition of ADAMTS4 (aggrecanase-1) by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, 2, 3 and 4). *FEBS Lett*. 2001 Apr 13; 494(3):192-5.

45. Kashiwagi M, Tortorella M, Nagase H, Brew K. TIMP-3 is a potent inhibitor of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) and aggrecanase 2 (ADAM-TS5). *J Biol Chem*. 2001 Apr 20; 276(16):12501-4.
46. Gendron C, Kashiwagi M, Hughes C, Caterson B, Nagase H. TIMP-3 inhibits aggrecanase-mediated glycosaminoglycan release from cartilage explants stimulated by catabolic factors. *FEBS Lett*. 2003 Dec 18; 555(3):431-6.
47. Sawaji Y, Hynes J, Vincent T, Saklatvala J. Fibroblast growth factor 2 inhibits induction of aggrecanase activity in human articular cartilage. *Arthritis Rheum*. 2008 Nov; 58(11):3498-509.
48. Tortorella MD, Arner EC, Hills R, Easton A, Korte-Sarfaty J, Fok K, Wittwer AJ, Liu RQ, Malfait AM. Alpha2-macroglobulin is a novel substrate for ADAMTS-4 and ADAMTS-5 and represents an endogenous inhibitor of these enzymes. *J Biol Chem*. 2004 Apr 23;279(17):17554-61.
49. Munteanu SE, Ilic MZ, Handley CJ. Calcium pentosan polysulfate inhibits the catabolism of aggrecan in articular cartilage explant cultures. *Arthritis Rheum*. 2000 Oct;43(10):2211-8.
50. Imada K, Lin N, Liu C, Lu A, Chen W, Yano M, Sato T, Ito A. Nobiletin, a citrus polymethoxy flavonoid, suppresses gene expression and production of aggrecanases-1 and -2 in collagen-induced arthritic mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Aug 22; 373(2):181-5.

51. Curtis CL, Rees SG, Little CB, Flannery CR, Hughes CE, Wilson C, Dent CM, Otterness IG, Harwood JL, Caterson B. Pathologic indicators of degradation and inflammation in human osteoarthritic cartilage are abrogated by exposure to n-3 fatty acids. *Arthritis Rheum.* 2002 Jun; 46(6):1544-53. Retraction in: Caterson B. *Arthritis Rheum.* 2006 Sep; 54(9):2933.

52. Hashimoto G, Shimoda M, Okada Y. ADAMTS4 (aggrecanase-1) interaction with the C-terminal domain of fibronectin inhibits proteolysis of aggrecan. *J Biol Chem.* 2004 Jul 30; 279(31):32483-91.

53. Sandy JD, Gamett D, Thompson V, Verscharen C. Chondrocyte-mediated catabolism of aggrecan: aggrecanase-dependent cleavage induced by interleukin-1 or retinoic acid can be inhibited by glucosamine. *Biochem J.* 1998 Oct 1;335 (Pt 1):59-66.

54. Patwari P, Kurz B, Sandy JD, Grodzinsky AJ. Mannosamine inhibits aggrecanase-mediated changes in the physical properties and biochemical composition of articular cartilage. *Arch Biochem Biophys.* 2000 Feb 1; 374(1):79-85.

55. Li X, Phillips FM, An HS, Ellman M, Thonar EJ, Wu W, Park D, Im HJ. The action of resveratrol, a phytoestrogen found in grapes, on the intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976).* 2008 Nov 15;33(24):2586-95.

56. Scotté M, Hiron M, Masson S, Lyoumi S, Banine F, Ténrière P, Lebreton JP, Daveau M. Differential expression of cytokine genes in monocytes, peritoneal macrophages and liver following endotoxin- or turpentine-induced inflammation in rat. *Cytokine.* 1996 Feb; 8(2):115-20.

57. Cross A, Edwards SW, Bucknall RC, Moots RJ. Secretion of oncostatin M by neutrophils in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2004 May;50(5):1430-6.
58. Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2011 Jan;7(1):33-42.
59. Burrage PS, Brinckerhoff CE. Molecular targets in osteoarthritis: metalloproteinases and their inhibitors. *Curr Drug Targets*. 2007 Feb;8(2):293-303.
60. Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology*. 2002;39(1-2):237-46.
61. Ahmad R, Sylvester J, Ahmad M, Zafarullah M. Adaptor proteins and Ras synergistically regulate IL-1-induced ADAMTS-4 expression in human chondrocytes. *J Immunol*. 2009 Apr 15; 182(8):5081-7.
62. El Mabrouk M, Sylvester J, Zafarullah M. Signaling pathways implicated in oncostatin M-induced aggrecanase-1 and matrix metalloproteinase-13 expression in human articular chondrocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Mar; 1773(3):309-20.
63. Goldring MB, Goldring SR. Osteoarthritis. *J Cell Physiol*. 2007 Dec; 213(3):626-34.
64. Dinarello CA. Interleukin-1. *Rev Infect Dis*. 1984 Jan-Feb; 6(1):51-95.

65. Arend WP, Palmer G, Gabay C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol Rev.* 2008 Jun;223:20-38.
66. Subramaniam S, Stansberg C, Cunningham C. The interleukin 1 receptor family. *Dev Comp Immunol.* 2004 May 3; 28(5):415-28.
67. Boraschi D, Bossu P, Macchia G, Ruggiero P, Tagliabue A. Structure-function relationship in the IL-1 family. *Front Biosci.* 1996 Oct 1; 1:d270-308.
68. Flannery SM, Keating SE, Szymak J, Bowie AG. Human interleukin-1 receptor-associated kinase-2 is essential for Toll-like receptor-mediated transcriptional and post-transcriptional regulation of tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem.* 2011 Jul 8; 286(27):23688-97.
69. Daun JM, Fenton MJ. Interleukin-1/Toll receptor family members: receptor structure and signal transduction pathways. *J Interferon Cytokine Res.* 2000 Oct;20(10):843-55.
70. Boraschi D, Tagliabue A. The interleukin-1 receptor family. *Vitam Horm.* 2006; 74:229-54.
71. O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol Rev.* 2008 Dec;226:10-8.
72. Dinarello CA. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol.* 2002 Sep-Oct; 20(5 Suppl 27):S1-13.

73. Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2010; 20(2):87-103.
74. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther*. 2008 Feb;117(2):244-79.
75. Zhang G. Tumor necrosis factor family ligand-receptor binding. *Curr Opin Struct Biol*. 2004 Apr; 14(2):154-60.
76. Feldmann M. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*. 2002 May; 2(5):364-71.
77. Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, Timour MS, Gerhart MJ, Schooley KA, Smith CA, Goodwin RG, Rauch CT. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J*. 1997 Sep 1; 16(17):5386-97.
78. Mitsiades CS, Poulaki V, Mitsiades N. The role of apoptosis-inducing receptors of the tumor necrosis factor family in thyroid cancer. *J Endocrinol*. 2003 Aug; 178(2):205-16.
79. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*. 2003 Jan; 10(1):45-65.
80. Carrington PE, Sandu C, Wei Y, Hill JM, Morisawa G, Huang T, Gavathiotis E, Wei Y, Werner MH. The structure of FADD and its mode of interaction with procaspase-8. *Mol Cell*. 2006 Jun 9;22(5):599-610.

81. Younes A, Aggarwall BB. Clinical implications of the tumor necrosis factor family in benign and malignant hematologic disorders. *Cancer*. 2003 Aug 1;98(3):458-67.
82. Gruss HJ. Molecular, structural, and biological characteristics of the tumor necrosis factor ligand superfamily. *Int J Clin Lab Res*. 1996;26(3):143-59.
83. Praveen K, Evans DL, Jaso-Friedmann L. Constitutive expression of tumor necrosis factor-alpha in cytotoxic cells of teleosts and its role in regulation of cell-mediated cytotoxicity. *Mol Immunol*. 2006 Feb; 43(3):279-91.
84. Monastra G, Cabrelle A, Zambon A, Rosato A, Macino B, Collavo D, Zanovello P. Membrane form of TNF alpha induces both cell lysis and apoptosis in susceptible target cells. *Cell Immunol*. 1996 Jul 10; 171(1):102-10.
85. Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest*. 2007 May; 117(5):1175-83.
86. Umlauf D, Frank S, Pap T, Bertrand J. Cartilage biology, pathology, and repair. *Cell Mol Life Sci*. 2010 Dec; 67(24):4197-211.
87. Westacott CI, Sharif M. Cytokines in osteoarthritis: mediators or markers of joint destruction? *Semin Arthritis Rheum*. 1996 Feb; 25(4):254-72.
88. Kobayashi M, Squires GR, Mousa A, Tanzer M, Zukor DJ, Antoniou J, Feige U, Poole AR. Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum*. 2005 Jan; 52(1):128-35.

89. Poole AR, Nelson F, Dahlberg L, Tchetina E, Kobayashi M, Yasuda T, Lavery S, Squires G, Kojima T, Wu W, Billingham RC. Proteolysis of the collagen fibril in osteoarthritis. *Biochem Soc Symp.* 2003; (70):115-23.
90. Bondeson J, Wainwright SD, Lauder S, Amos N, Hughes CE. The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2006; 8(6):R187.
91. Barakat AF, Elson CJ, Westacott CI. Susceptibility to physiological concentrations of IL-1 β varies in cartilage at different anatomical locations on human osteoarthritic knee joints. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002 Apr;10(4):264-9.
92. Smith MD, Triantafillou S, Parker A, Youssef PP, Coleman M. Synovial membrane inflammation and cytokine production in patients with early osteoarthritis. *J Rheumatol.* 1997 Feb; 24(2):365-71.
93. Daheshia M, Yao JQ. The interleukin 1 β pathway in the pathogenesis of osteoarthritis. *J Rheumatol.* 2008 Dec;35(12):2306-12.
94. Goldring MB. Osteoarthritis and cartilage: the role of cytokines. *Curr Rheumatol Rep.* 2000 Dec;2(6):459-65.
95. Nakamura H, Yoshino S, Kato T, Tsuruha J, Nishioka K. T-cell mediated inflammatory pathway in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 1999 Jul; 7(4):401-2.

96. Saxne T, Heinegård D, Wollheim FA, Pettersson H. Difference in cartilage proteoglycan level in synovial fluid in early rheumatoid arthritis and reactive arthritis. *Lancet*. 1985 Jul 20; 2(8447):127-8.
97. Gouze JN, Bordji K, Gulberti S, Terlain B, Netter P, Magdalou J, Fournel-Gigleux S, Ouzzine M. Interleukin-1beta down-regulates the expression of glucuronosyltransferase I, a key enzyme priming glycosaminoglycan biosynthesis: influence of glucosamine on interleukin-1beta-mediated effects in rat chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2001 Feb; 44(2):351-60.
98. Kojima F, Naraba H, Miyamoto S, Beppu M, Aoki H, Kawai S. Membrane-associated prostaglandin E synthase-1 is upregulated by proinflammatory cytokines in chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2004; 6(4):R355-65. Epub 2004 Jun 8.
99. Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol*. 1995 Jan; 146(1):75-85.
100. López-Armada MJ, Caramés B, Lires-Deán M, Cillero-Pastor B, Ruiz-Romero C, Galdo F, Blanco FJ. Cytokines, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta, differentially regulate apoptosis in osteoarthritis cultured human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006 Jul; 14(7):660-9.
101. Lockshin RA, Zakeri Z. Caspase-independent cell deaths. *Curr Opin Cell Biol*. 2002 Dec; 14(6):727-33.
102. Hashimoto S, Ochs RL, Rosen F, Quach J, McCabe G, Solan J, Seegmiller JE, Terkeltaub R, Lotz M. Chondrocyte-derived apoptotic bodies and calcification of articular cartilage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 17; 95(6):3094-9.

103. Blom AB, Brockbank SM, van Lent PL, van Beuningen HM, Geurts J, Takahashi N, van der Kraan PM, van de Loo FA, Schreurs BW, Clements K, Newham P, van den Berg WB. Involvement of the Wnt signaling pathway in experimental and human osteoarthritis: prominent role of Wnt-induced signaling protein 1. *Arthritis Rheum.* 2009 Feb; 60(2):501-12.
104. Yuasa T, Otani T, Koike T, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M. Wnt/beta-catenin signaling stimulates matrix catabolic genes and activity in articular chondrocytes: its possible role in joint degeneration. *Lab Invest.* 2008 Mar; 88(3):264-74.
105. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood.* 2011 Apr 7; 117(14):3720-32.
106. Wald D, Qin J, Zhao Z, Qian Y, Naramura M, Tian L, Towne J, Sims JE, Stark GR, Li X. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol.* 2003 Sep; 4(9):920-7.
107. Goldring MB. Anticytokine therapy for osteoarthritis. *Expert Opin Biol Ther.* 2001 Sep; 1(5):817-29.
108. Avruch J., Zhang X. F., Kyriakis J. M. (1994): Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends. Biochem. Sci.* 19, 279|283.
109. Perkins ND. The Rel/NF-kappa B family: friend and foe. *Trends Biochem Sci* 2000; 25:434–40.
110. Gemba T, Valbracht J, Alsalameh S, Lotz M. Focal adhesion kinase and mitogen-activated protein kinases are involved in chondrocyte activation by the 29-

- kDa amino-terminal fibronectin fragment. *J Biol Chem* 2002 Jan 11; 277 (2): 907-11.
111. Forsyth CB, Pulai J, Loeser RF: Fibronectin fragments and blocking antibodies to $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 5\beta 1$ integrins stimulate mitogen-activated protein kinase signaling and increase collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) production by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2002, 46:2368–2376.
 112. Loeser RF, Forsyth CB, Samarel AM, et al.: Fibronectin fragment activation of proline-rich tyrosine kinase PYK2 mediates integrin signals regulating collagenase- 3 expression by human chondrocytes through a protein kinase Cdependent pathway. *J Biol Chem* 2003, 278:24577–24585.
 113. Martel-Pelletier J, Mineau F, Jovanovic D, et al.: Mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappaB together regulate interleukin-17-induced nitric oxide production in human osteoarthritic chondrocytes: possible role of transactivating factor mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase (MAPKAPK). *Arthritis Rheum* 1999, 42:2399–2409.
 114. Lo YY, Wong JM, Cruz TF et al.: Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-Jun NH2-terminal kinases. *J Biol Chem* 1996, 271:15703– 15707.
 115. Fujino H, Xu W, Regan JW: Prostaglandin E2 induced functional expression of early growth response factor-1 by EP4, but not EP2, prostanoid receptors via the phosphatidyl- inositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem* 2003, 278:12151–12156.

116. Pufe T, Harde V, Petersen W, et al.: Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces matrix metalloproteinase expression in immortalized chondrocytes. *J Pathol* 2004, 202:367–374.
117. Berenbaum F, Humbert L, Bereziat G, et al.: Concomitant recruitment of ERK1/2 and p38 MAP kinase signaling pathway is required for activation of cPLA2 via ATP in articular chondrocytes. *J Biol Chem* 2003, 278:13680–13687.
118. Dong C, Davis RJ, Flavell RA. Map kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:55–72.
119. Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 1998; 74:49–139.
120. Cobb M. H., Goldsmith E. J. (1995): How MAP kinase are regulated. *J. Biol. Chem.* 270, 14843|14846.
121. Hommes DW, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut.* 2003 Jan; 52(1):144-51.
122. Marshall C. J. (1994): MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *curr. Opin. Genet. Dev.* 4, 82|89.
123. Garrington TP, Johnson GL: Organization and regulation of mitogenactivated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1999, 11:211–218.
124. Johnson GL, Lapadat R: Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002, 298:1911–1912.

125. Morel J, Berenbaum F: Signaling pathways: new targets for treating rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2004 Nov; 71 (6): 503-10.
126. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001; 81:807–69.
127. Robinson M. J., Cobb M. H. (1997): Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 180|186.
128. Chang L., Karin M. (2001): Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature* 410, 37|40.
129. Berenbaum F. Signaling transduction: target in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2004 Sep; 16(5):616-22.
130. Thalhamer T, McGrath MA, Harnett MM. MAPKs and their relevance to arthritis and inflammation. *Rheumatology (Oxford)*. 2008 Apr; 47(4):409-14.
131. Sondergaard BC, Schultz N, Madsen SH, Bay-Jensen AC, Kassem M, Karsdal MA. MAPKs are essential upstream signaling pathways in proteolytic cartilage degradation--divergence in pathways leading to aggrecanase and MMP-mediated articular cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010 Mar; 18(3):279-88.
132. Loeser RF, Erickson EA, Long DL. Mitogen-activated protein kinases as therapeutic targets in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2008 Sep; 20(5):581-6.

133. Gupta S, Campbell D, Derijard B, et al. Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* 1995; 267:389–93.
134. Lin L. L., Wartmann M., Lin A. Y., Knopf J. L., Seth A., Davis R. J. (1993): cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* 72, 269|278.
135. Wang Y. Mitogen-activated protein kinases in heart development and diseases. *Circulation*. 2007 Sep 18; 116(12):1413-23.
136. Seguin CA, Bernier SM: TNF α suppresses link protein and type II collagen expression in chondrocytes: role of MEK1/2 and NF-kappaB signaling pathways. *J Cell Physiol* 2003, 197:356–369.
137. Masuko–Hongo K, Berenbaum F, Humbert L, Salvat C, Goldring MB, Thirion S. Up-regulation of microsomal prostaglandin E synthase-1 in osteoarthritic human cartilage: critical roles of the ERK1/2 and p38 signaling pathways. *Arthritis Rheum*. 2004 Sep; 50 (9): 2829-38.
138. Pelletier JP, Fernandes JC, Brunet J, et al.: In vivo selective inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 in rabbit experimental osteoarthritis is associated with a reduction in the development of structural changes. *Arthritis Rheum* 2003, 48:1582–1593.
139. Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, et al. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 1994; 372:739–746.

140. Jiang Y, Chen C, Li Z, Guo W, Gegner JA, Lin S, et al. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem* 1996; 271:17920–17926.
141. Lechner C, Zahalka MA, Giot JF, Moller NP, Ullrich A. ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:4355–4359.
142. Jiang Y, Gram H, Zhao M, New L, Gu J, Feng L, et al. Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases p38delta. *J Biol Chem* 1997; 272:30122–30128.
143. Ono K, The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* 2000; 12:1–13.
144. Han J, Lee J. D., Tobias P. S., Ulevitch R. J. Endotoxin induces rapid protein tyrosine phosphorylation in 70Z cells expressing CD14. *J Biol Chem.* 1993 Nov 25; 268 (33): 25009-14.
145. Gortz B, Hayer S, Tuerck B, Zwerina J, Smolen JS, Schett G. Tumour necrosis factor activates the mitogen-activated protein kinases p38alpha and ERK in the synovial membrane in vivo. *Arthritis Res Ther* 2005; 7:R1140–R1147.
146. Moriguchi T., Toyoshima F., Gotoh Y., Iwamatsu A., Irie K., Mori E., Kuroyanagi N., Hagiwara M., Matsumoto K., Nishida E. (1996): Purification and identification of a major activator for p38 from osmotically shocked cells. Activation of mitogenactivated protein kinase kinase 6 by osmotic shock, tumor necrosis factor- , and H2O2. *J. Biol. Chem.* 271, 26981|26988.

147. Foltz IN, Lee JC, Young PR, et al. Hemopoietic growth factors with the exception of interleukin-4 activate the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 1997; 272:3296–301.
148. Tan Y., Rouse J., Zhang A., Cariatì S., Cohen P., Comb M. J. (1996): FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *EMBO J.* 15, 4629|4642.
149. Han J., Lee J. D., Jiang Y., Li Z., Feng L., Ulevitch R. J. (1996): Characterization of the structure and function of a novel MAP kinase kinase (MKK 6). *J. Biol. Chem.* 271, 2886|2891.
150. Kumar S, Boehm J, Lee JC. p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2:717–26.
151. Raingeaud J, Gupta S., Rogers J. S., Dickens M., Han J., Ulevitch R. J., Davis R. J. (1995): Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogenactivated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem.* 270, 7420|7426.
152. Hazzalin C. A., Cano E., Cuenda A., Barratt M. J., Cohen P., Mahadevan L. C. (1996): p38/RK is essential for stress-induced nuclear responses: JNK/SAPKs and c-Jun/ATF-2 phosphorylation are insufficient. *Curr. Biol.* 6, 1028|1031.
153. Wang X. Z., Ron D. (1996): Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD 153) by p38 MAP kinase. *Science* (Washington, D. C.) 272, 1347|1349.

154. Han J., Jiang Y., Li Z., Kravchenko V. V., Ulevitch R. J. (1997): Activation of the transcription factor MEF 2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature* 386, 296|299.
155. Janknecht R., Hunter T. (1997): Convergence of MAP kinase pathways on the ternary complex factor Sap-1a. *EMBO J.* 16, 1620|1627.
156. Whitmarsh A. J., Yang S. H., Su M. S., Sharrocks A. D., Davis R. J. (1997): Role of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in the activation of ternary complex factors. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2360|2371.
157. Bergmann M, Hart L, Lindsay M, et al. IkappaBalpha degradation and nuclear factor-kappaB DNA binding are insufficient for interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha- induced kappaB-dependent transcription. Requirement for an additional activation pathway. *J Biol Chem* 1998; 273:6607–10.
158. Nick JA, Avdi NJ, Young SK, et al. Selective activation and functional significance of p38alpha mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-stimulated neutrophils. *J Clin Invest* 1999; 103:851–8.
159. Read MA, Whitley MZ, Gupta S, et al. Tumor necrosis factor alpha-induced E-selectin expression is activated by the nuclear factor-kappaB and c-JUN N-terminal kinase/p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 1997; 272:2753–61.
160. Hannigan M, Zhan L, Ai Y, et al. The role of p38 MAP kinase in TGF-beta1-induced signal transduction in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246:55–8.

161. Zu YL, Qi J, Gilchrist A, et al. p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for human neutrophil function triggered by TNF-alpha or FMLP stimulation. *J Immunol* 1998; 160:1982–9.
162. Clerk A,, Sugden P. H. (1999): Activation of protein kinase cascades in the heart by hypertrophic G protein-coupled receptor agonists. *Am. J. Cardiol.* 83, H 64|69.
163. Fan Z, Soder S, Oehler S, et al. Activation of interleukin-1 signaling cascades in normal and osteoarthritic articular cartilage. *Am J Pathol* 2007; 171:938–46.
164. Masuko K, Murata M, Nakamura H, et al. Sphingosine-1-phosphate attenuates proteoglycan aggrecan expression via production of prostaglandin E2 from human articular chondrocytes. *BMC Musculoskelet Disord* 2007; 8:29.
165. Papachristou DJ, Papadakou E, Basdra EK, et al. Involvement of the p38 MAPK-NF-kappaB Signal Transduction Pathway and COX-2 in the Pathobiology of Meniscus Degeneration in Humans. *Mol Med* 2008; 14:160–6.
166. Ehling A, Schaffler A, Herfarth H, et al. The potential of adiponectin in driving arthritis. *J Immunol* 2006; 176:4468–78.
167. Kyriakis J. M., Banerjee P., Nikolakaki E., Dai T., Rubie E. A., Ahmad M. F., Avruch J., Woodgett J. R. (1994): The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369, 156|160.
168. Pulverer B. J., Kyriakis J. M., Avruch J., Nikolakaki E., Woodgett J. R. (1991): Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* 353, 670|674.
169. Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, et al. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J* 1996; 15:2760–70.

170. Strnisková M, Barancík M, Ravingerová T. Mitogen-activated protein kinases and their role in regulation of cellular processes. *Gen Physiol Biophys*. 2002 Sep; 21(3):231-55.
171. Weston CR, Davis RJ. The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12:14–21.
172. Hibi M., Lin A., Smeal T., Minden A., Karin M. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev*. 1993 Nov; 7 (11): 2135-48.
173. Derijard B., Hibi M., Wu I. H., Barrett T., Su B., Deng T., Karin M., Davis R. J. (1994): JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76, 1025|1037.
174. Gupta S, Campbell D., Derijard B., Davis R. J. (1995): Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science (Washington, D. C.)* 267,389|393.
175. Gross A., McDonnell J. M., Korsmeyer S. J. (1999): BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 13, 1899|1911.
176. Aguirre V., Uchida T., Yenush L., Davis R., White M. F. (2000): The c-Jun NH (2) - terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J. Biol. Chem.* 275, 9047|9054.
177. Whitmarsh A. J., Shore P., Sharrocks A. D., Davis R. J. (1995): Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science (Washington, D. C.)* 269, 403|407.

178. Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimnual A, Bar-Sagi D, Jones SN, Flavell RA, Davis RJ. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science*. 2000 May 5; 288(5467):870-4.
179. Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*. 2000; 103:239–252.
180. Han Z, Boyle DL, Chang L, et al. c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 2001; 108:73–81.
181. Yang DD, Conze D, Whitmarsh AJ, et al. Differentiation of CD4+ T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2. *Immunity* 1998; 9:575–85.
182. Geng Y, Valbracht J, Lotz M: Selective activation of the mitogen-activated protein kinase subgroups c-Jun NH2 terminal kinase and p38 by IL-1 and TNF in human articular chondrocytes. *J Clin Invest* 1996, 98:2425–2430.
183. Miller C, Zhang M, He Y, et al.: Transcriptional induction of cyclooxygenase-2 gene by okadaic acid inhibition of phosphatase activity in human chondrocytes: co-stimulation of AP-1 and CRE nuclear binding proteins. *J Cell Biochem* 1998, 69:392–413.
184. Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, et al.: Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum* 2000, 43:801–811.
185. Boileau C, Martel-Pelletier J, Brunet J, et al. PD-0200347, an $\alpha_2\delta$ ligand of the voltage gated calcium channel, inhibits in vivo activation of the Erk1/2

- pathway in osteoarthritic chondrocytes: a PKC α dependent effect. *Ann Rheum Dis* 2006; 65:573–80.
186. Bellacosa A, Testa JR, Staal SP, Tsichlis PN. A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science*. 1991 Oct 11; 254(5029):274-7.
 187. Downward J. Ras signalling and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev*. 1998 Feb; 8(1):49-54.
 188. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*. 1997 Feb 21; 88(4):435-7.
 189. Marte BM, Downward J. PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem Sci*. 1997 Sep; 22(9):355-8.
 190. Yasuda T. Activation of Akt leading to NF- κ B up-regulation in chondrocytes stimulated with fibronectin fragment. *Biomed Res*. 2011; 32(3):209-15.
 191. Dillon RL, White DE, Muller WJ. The phosphatidyl inositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer. *Oncogene* 2007; 26:1338–45.
 192. Coloff JL, Macintyre AN, Nichols AG, Liu T, Gallo CA, Plas DR, Rathmell JC. Akt-dependent glucose metabolism promotes Mcl-1 synthesis to maintain cell survival and resistance to Bcl-2 inhibition. *Cancer Res*. 2011 Aug 1; 71(15):5204-13.
 193. Downward J. Lipid-regulated kinases: some common themes at last. *Science*. 1998 Jan 30; 279(5351):673-4.

194. Dillon RL, Muller WJ. Distinct biological roles for the akt family in mammary tumor progression. *Cancer Res.* 2010 Jun 1; 70(11):4260-4.
195. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3 kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8:627–44.
196. Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A. Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol.* 1999 Jun 3; 9(11):601-4.
197. Brown K, Claudio E and siebenlist U (2003) NF- κ B. In: *Targeted Therapies in Rheumatology* (Smolen JS and Lipsky PE, eds), pp381-401, Martin Dunitz, London.
198. Hallstrom TC, Nevins JR. Specificity in the activation and control of transcription factor E2F-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Sep 16; 100(19):10848-53.
199. Wang JM, Chao JR, Chen W, Kuo ML, Yen JJ, Yang-Yen HF. The antiapoptotic gene mcl-1 is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB. *Mol Cell Biol.* 1999 Sep; 19(9):6195-206.
200. Yen K, Narasimhan SD, Tissenbaum HA. DAF-16/Forkhead box O transcription factor: many paths to a single Fork (head) in the road. *Antioxid Redox Signal.* 2011 Feb 15; 14(4):623-34.

201. Li X, Tupper JC, Bannerman DD, Winn RK, Rhodes CJ, Harlan JM. Phosphoinositide 3 kinase mediates Toll-like receptor 4-induced activation of NF-kappa B in endothelial cells. *Infect Immun*. 2003 Aug; 71(8):4414-20.
202. Jeno P, Ballou LM, Novak-Hofer I, Thomas G. Identification and characterization of a mitogen-activated S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:406–10.
203. Banerjee P, Ahmad MF, Grove JR, Kozlosky C, Price DJ, Avruch J. Molecular structure of a major insulin/mitogen-activated 70-kDa S6 protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:8550–4.
204. Lee-Fruman KK, Kuo CJ, Lippincott J, Terada N, Blenis J. Characterization of S6K2, a novel kinase homologous to S6K1. *Oncogene* 1999; 18:5108–14.
205. Weng Qp, Kozlowski M, Belham C, Zhang A, Comb MJ, Avruch J. Regulation of the p70 S6 kinase by phosphorylation in vivo. Analysis using site-specific antiphosphopeptide antibodies. *J Biol Chem* 1998; 273:16621–9.
206. Burnett PE, Blackshaw S, Lai MM, Qureshi IA, Burnett AF, Sabatini DM, et al. Neurabin is a synaptic protein linking p70 S6 kinase and the neuronal cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998b; 95:8351–6.
207. Mora A, Komander D, van Aalten DMF, Alessi DR. PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Semin Cell Dev Biol* 2004; 15:161–70.
208. Mukhopadhyay NK, Price DJ, Kyriakis JM, Pelech S, Sanghera J, Avruch J. An array of insulin-activated, proline-directed serine/threonine protein kinases phosphorylates the p70 S6 kinase. *J Biol Chem* 1992; 267:3325–35.

209. Raught B, Peiretti F, Gingras AC, Livingstone M, Shahbazian D, Mayeur GL, et al. Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *Embo J* 2004; 23:1761–9.
210. Wang X, Li W, Williams M, Terada N, Alessi DR, Proud CG. Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *Embo J* 2001; 20:4370–9.
211. Goh ETH, Pardo OE, Michael N, Niewiarowski A, Totty N, Volkova D, et al. Involvement of heterogeneous ribonucleoprotein F in the regulation of cell proliferation via the mammalian target of rapamycin/S6 kinase 2 pathway. *J Biol Chem* 2010; 285:17065–76.
212. De Groot RP, Ballou LM, Sassone-Corsi P. Positive regulation of the cAMP-responsive activator CREM by the p70 S6 kinase: an alternative route to mitogen-induced gene expression. 1994;79:81–91.
213. Dorrello NV, Peschiaroli A, Guardavaccaro D, Colburn NH, Sherman NE, Pagano M. S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science* 2006; 314:467–71.
214. Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, Sticker M, et al. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 2004; 431:200–5.
215. Sun S-Y, Rosenberg LM, Wang X, Zhou Z, Yue P, Fu H, et al. Activation of Akt and eIF4E survival pathways by rapamycin-mediated mammalian target of rapamycin inhibition. *Cancer Res* 2005; 65:7052–8.
216. Price D, Grove JR, Calvo V, Avruch J, Bierer B. Rapamycin-induced inhibition of the 70-kilodalton S6 protein kinase. *Science* 1992; 257:973–7.

217. Vézina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)*. 1975 Oct;28(10):721-6.
218. Eng CP, Sehgal SN, Vézina C. Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors. *J Antibiot (Tokyo)*. 1984 Oct;37(10):1231-7.
219. Sehgal S.N., Baker, H. & Vezina, C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiot. (Tokyo)* 28, 727–732 (1975).
220. Calne RY, Collier DS, Lim S, Pollard SG, Samaan A, White DJ, Thiru S. Rapamycin for immunosuppression in organ allografting. *Lancet*. 1989 Jul 22;2(8656):227.
221. Dilling MB, Dias P, Shapiro DN, Germain GS, Johnson RK, Houghton PJ. Rapamycin selectively inhibits the growth of childhood rhabdomyosarcoma cells through inhibition of signaling via the type I insulin-like growth factor receptor. *Cancer Res*. 1994 Feb 15;54(4):903-7.
222. Geoerger B, Kerr K, Tang CB, Fung KM, Powell B, Sutton LN, Phillips PC, Janss AJ. Antitumor activity of the rapamycin analog CCI-779 in human primitive neuroectodermal tumor/medulloblastoma models as single agent and in combination chemotherapy. *Cancer Res*. 2001 Feb 15; 61(4):1527-32.
223. Ogawa T, Tokuda M, Tomizawa K, Matsui H, Itano T, Konishi R, Nagahata S, Hatase O. Osteoblastic differentiation is enhanced by rapamycin in rat osteoblast-

- like osteosarcoma (ROS 17/2.8) cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Aug 10; 249(1):226-30.
224. Grewe M, Gansauge F, Schmid RM, Adler G, Seufferlein T. Regulation of cell growth and cyclin D1 expression by the constitutively active FRAP p70s6K pathway in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res*. 1999 Aug 1; 59(15):3581-7.
225. Yu K, Toral-Barza L, Discafani C, Zhang WG, Skotnicki J, Frost P, Gibbons JJ. mTOR, a novel target in breast cancer: the effect of CCI-779, an mTOR inhibitor, in preclinical models of breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2001 Sep;8(3):249-58.
226. Hultsch T, Martin R, Hohman RJ. The effect of the immunophilin ligands rapamycin and FK506 on proliferation of mast cells and other hematopoietic cell lines. *Mol Biol Cell*. 1992 Sep;3(9):981-7.
227. Muthukkumar S, Ramesh TM, Bondada S. Rapamycin, a potent immunosuppressive drug, causes programmed cell death in B lymphoma cells. *Transplantation*. 1995 Aug 15; 60(3):264-70.
228. Dumont F.J. & Su, Q. Mechanism of action of the immunosuppressant rapamycin. *Life Sci*. 58, 373–395 (1996).
229. Hartford CM, Ratain MJ. Rapamycin: something old, something new, sometimes borrowed and now renewed. *Clin Pharmacol Ther*. 2007 Oct; 82(4):381-8.
230. Little CB, Hughes CE, Curtis CL, Jones SA, Caterson B, Flannery CR. Cyclosporin A inhibition of aggrecanase-mediated proteoglycan catabolism in articular cartilage. *Arthritis Rheum*. 2002 Jan; 46(1):124-9.

231. Caramés B, Hasegawa A, Taniguchi N, Miyaki S, Blanco FJ, Lotz M. Autophagy activation by rapamycin reduces severity of experimental osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011 Nov 14.
232. Liacini A, Sylvester J, Li WQ, Zafarullah M. Inhibition of interleukin-1-stimulated MAP kinases, activating protein-1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF-kappa B) transcription factors down-regulates matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes. *Matrix Biol*. 2002 Apr;21(3):251-62.
233. Sylvester J, Liacini A, Li WQ, Zafarullah M. Interleukin-17 signal transduction pathways implicated in inducing matrix metalloproteinase-3, -13 and aggrecanase-1 genes in articular chondrocytes. *Cell Signal*. 2004 Apr;16(4):469-76.
234. Saxena A, Raychaudhuri SK, Raychaudhuri SP. Interleukin-17-induced proliferation of fibroblast-like synovial cells is mTOR dependent. *Arthritis Rheum*. 2011 May; 63(5):1465-6.
235. Wang X, Yue P, Kim YA, Fu H, Khuri FR, Sun SY. Enhancing mammalian target of rapamycin (mTOR)-targeted cancer therapy by preventing mTOR/raptor inhibition-initiated, mTOR/rictor-independent Akt activation. *Cancer Res* 2008; 68:7409–7418.
236. Fenton TR, Gout IT. Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011 Jan;43(1):47-59.
237. Raught B, Peiretti F, Gingras AC, Livingstone M, Shahbazian D, Mayeur GL, et al. Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *Embo J* 2004;23:1761–9.

238. Wang X, Williams M, Terada N, Alessi DR, Proud CG. Regulation of elongation factor 2 kinase by p90 (RSK1) and p70 S6 kinase. *Embo J* 2001; 20:4370–9.
239. Pratta MA, Su JL, Leesnitzer MA, Struglics A, Larsson S, Lohmander LS, Kumar S. Development and characterization of a highly specific and sensitive sandwich ELISA for detection of aggrecanase-generated aggrecan fragments. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006 Jul; 14(7):702-13.
240. Cejka D, Hayer S, Niederreiter B, Sieghart W, Fuereder T, Zwerina J, Schett G. Mammalian target of rapamycin signaling is crucial for joint destruction in experimental arthritis and is activated in osteoclasts from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010 Aug; 62(8):2294-302.

